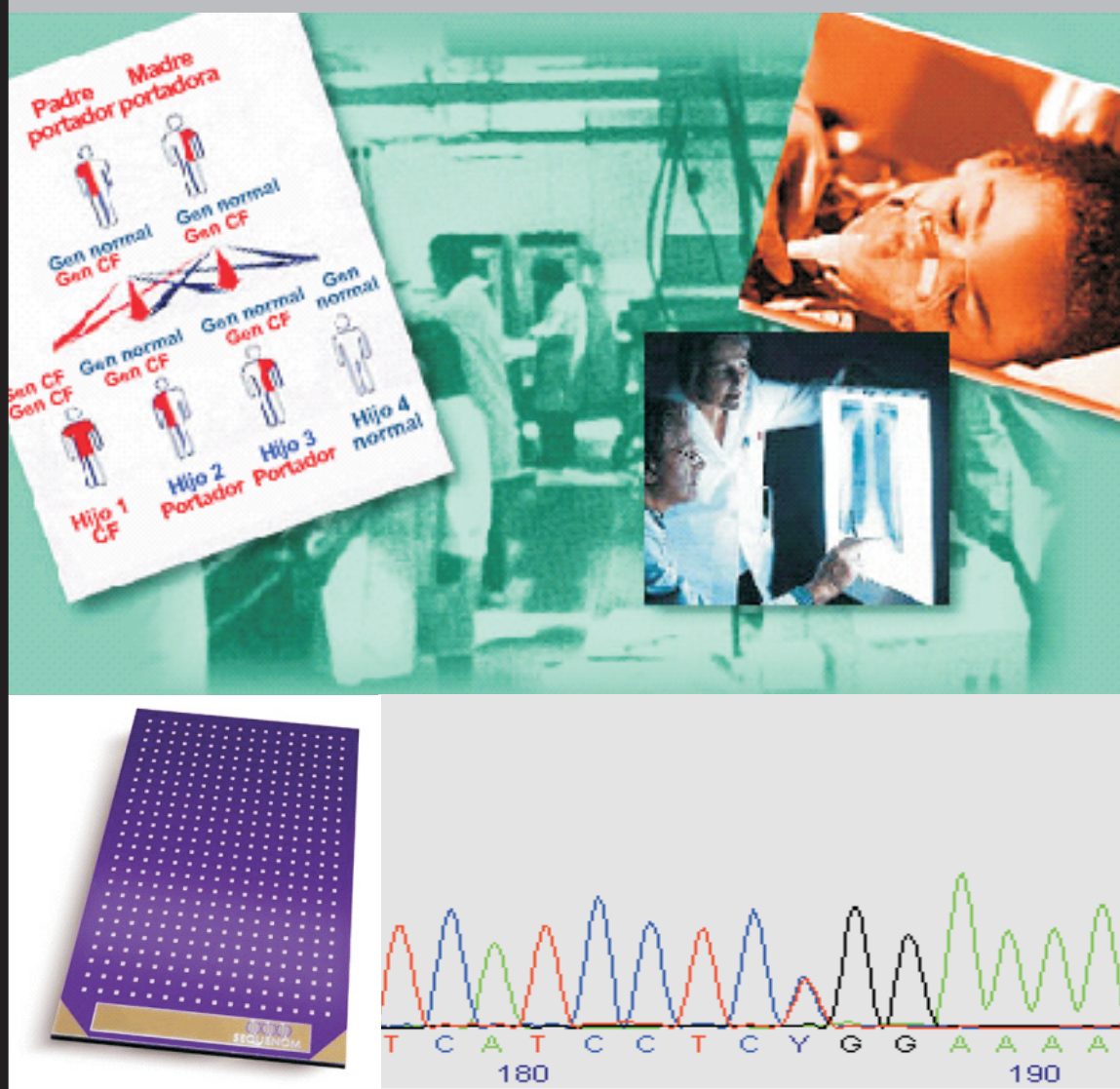


DESARROLLO DE NUEVAS TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS GENÉTICO EN FIBROSIS QUÍSTICA: APLICACIÓN AL CRIBADO NEONATAL



**INSTITUTO DE MEDICINA LEGAL
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**



**“DESARROLLO DE NUEVAS TÉCNICAS PARA EL
ANÁLISIS GENÉTICO EN FIBROSIS QUÍSTICA:
APLICACIÓN AL CRIBADO NEONATAL”**

Memoria que presenta, para optar al grado de doctor,

Pablo Raña Díez

En Santiago de Compostela, junio de 2008.

El Doctor D. **Ángel Carracedo Álvarez**, Catedrático de Medicina Legal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y el Doctor D. **Francisco Barros Angueira**,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria que lleva por título "DESARROLLO DE NUEVAS TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS GENÉTICO EN FIBROSIS QUÍSTICA: APLICACIÓN AL CRIBADO NEONATAL", del licenciado en Farmacia por la Universidad de Santiago de Compostela **Pablo Raña Díez**, ha sido realizada bajo nuestra dirección, considerándolo en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándolo para su presentación ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expedimos el presente certificado en Santiago de Compostela, a 13 de junio de 2008.

Fdo.: Prof.Dr. **Ángel Carracedo Álvarez**

Fdo: Dr. **Francisco Barros Angueira**

Fdo: **Pablo Raña Díez**

Exsiliium hominis ignorantia, patria est sapientia. De hoc exsilio ad patriam via est scientia.

(El exilio del hombre es la ignorancia, su patria es la sabiduría. De ese exilio a la patria el camino es la ciencia).

HONORIO DE AUTUN (Siglo XII), *De animae exsilio et patria* (Sobre el exilio y la patria del alma).

AGRADECIMIENTOS

Ponerse a pensar en todas aquellas personas a las que uno debe estar agradecido durante todos estos años me ha resultado una tarea muy grata ya que me he dado cuenta de la infinidad de relaciones humanas que han surgido durante la realización de esta pequeña odisea que ha sido mi Tesis Doctoral.

- En primer lugar comenzaré los agradecimientos, como no, por la Unidad de Medicina Molecular, mi *otra casa* durante todos estos años. Como no se me ocurre un orden lógico de agradecimientos, llevaré uno *absurdo* de manera que iré nombrando a la gente siguiendo el orden de entrada por el pasillo de la Unidad. Mis agradecimientos:

A Ana Ézara, la *organización personificada*, por su ayuda y consejos para lidiar con la, por desgracia frecuente, burocracia que rodea al becario investigador y que tan importante resulta para poder seguir adelante.

A Ana Vega y Clara Ruiz, por su trato amable y su disposición para resolverme cualquier duda o problema que me surgía.

A Celsa Quinteiro, la *Dra Quinn*, por su sentido del humor y por ese toque de sarcasmo que aporta tan necesario para despertar de la, en ocasiones, soporífera rutina del laboratorio.

A las técnico *cum laude* del laboratorio (Rocío, Marga y Lucía) a las que no había muestra que se les resistiera para obtener ADN. Espero que algún día me dejéis de tener miedo cuando entro por la puerta con nuevas manchas.

A la nueva hornada de técnicos (Bego, María, Olga...), por hacerme siempre un hueco en los turnos de termociclador en esos días de muestras urgentes.

A las nuevas incorporaciones de *doctorandings* (Carla, Marcos, Billy...), por ese aire fresco tan necesario que aportan al trabajo en el laboratorio.

A la *cuchipandi* del *Nesquik* (Ana Blanco, Nuria Gómez, Ceres...), por aguantar mis filosofadas y mis chistes malos durante tantos y tantos días sin tirarme el café a la cara.

A los compañeros con los que comencé la Tesis (Iván, Tono y Silvia) con los que he compartido mis *inquedanzas* en tantas ocasiones. Espero, para los que ya no estáis, que os vaya bien con vuestros nuevos rumbos.

A Alejandro Gesteira, mi gran maestro de la informática (entre otras cosas) durante todos estos años. Gracias por estar siempre ahí para responderme a cualquier duda con ese sosiego y amabilidad de los que muchos deberían aprender.

A Ana FM, por aportarme una visión de la realidad *políticamente correcta*.

A las *neurogenéticas* (Susi, Bea Q, Patricia), por esa motivación que me aporta teneros aquí al lado discutiendo de vuestras ideas para nuevos proyectos.

Al equipo Sequenom del CeGen (Inés y su *espada láser*, Chris *gadget man*, Rosanna y MariTo) por vuestra ayuda imprescindible para haber logrado desarrollar los chips y por vuestra paciencia mes a mes con las muestras de cribado.

A los *pesos pesados* (Xabi Costas, Rosa, Xulio, Carolina), por servirme de ejemplo a seguir en el campo de la investigación. Gracias, Rosa, por conseguirme esos *papers* imposibles que nunca era capaz de encontrar.

A Jorge Amigo, por su ayuda para resolverme cualquier tipo de problemas informáticos.

A Luli y Fernando, por su amistad y por servirme de ejemplo a seguir tanto en lo profesional como en lo personal y lo *deportivo*.

A Ángel Carracedo, por su calidad humana y por haberme apoyado siempre en todo lo que he hecho.

A Francisco Barros (Pancho), mi guía y mentor durante estos años para el que mi gratitud nunca podrá ser suficiente. Gracias por tu paciencia escuchándome durante tantas horas a lo largo de estos años y por todas esas cosas que me has enseñado (más de las que crees, seguro) en este vertiginoso mundo de la genética médica (quién le manda a un farmacéutico meterse en esto...) y en el mundo laboral en general.

- A los integrantes del grupo gallego de trabajo en fibrosis quística del CHUS:

A la Dra. Pavón, Dr. Cabanas y Dra. Alonso; por motivarme a seguir trabajando al mostrarme en las reuniones que lo que hacía estaba sirviendo para algo.

Al Dr. José Ramón Alonso, por ese sentido común y tranquilidad que siempre aportaba a nuestras reuniones y por su ayuda siempre que la he necesitado.

Al Dr. Colón, principal *culpable* de que este proyecto de investigación llegara a buen puerto, por su persistencia en el afán de querer introducir la genética en campo de las metabolopatías y por su calidad en el trato personal. Gracias por estar siempre disponible (*sin cita previa*) para resolverme todas las dudas que me han surgido a la hora de elaborar esta memoria.

- Al Dr. Barcia, Dra. Lamas y Dr. Echarri (del Servicio de Farmacia del Hospital de Conxo), por ser los primeros en hacerme pensar en trabajar en investigación en el grupo en el que ahora trabajo.

- A mi mujer, mi mayor tesoro, que siempre ha sabido sacar lo mejor de mí durante estos 12 años que llevamos juntos. Gracias por tu amor y apoyo incondicionales que dan sentido a mi vida.

- A mis padres y a mi hermano, a quienes les debo todo lo que soy.

- A Dios, por darme la fuerza necesaria para creer en lo que hago y no perder nunca la alegría.

A todos, de corazón, **GRACIAS.**

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

I.1.- INTRODUCCIÓN	19
I.2.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	21
I.3.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	24
I.3.1.- PATOLOGÍA RESPIRATORIA.....	25
I.3.2.- PATOLOGÍA DIGESTIVA	26
I.3.3.- PATOLOGÍA REPRODUCTIVA.....	27
I.3.4.- PATOLOGÍA NUTRICIONAL	28
I.4.- TRATAMIENTO	29
I.5.- DIAGNÓSTICO.....	30
I.5.1.- DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	30
I.5.2.- DIAGNÓSTICO MOLECULAR	34
I.5.3.- CRIBADO NEONATAL PARA LA FIBROSIS QUÍSTICA.....	35
I.5.3.1.- FUNDAMENTO	35
I.5.3.2.- APROXIMACIONES ACTUALES.....	39
I.5.3.3.- PROGRAMAS DE CRIBADO NEONATAL EN EL MUNDO	42
I.6.- GENÉTICA	43
I.6.1.- EPIDEMIOLOGÍA DE LA FIBROSIS QUÍSTICA	43
I.6.1.1.- TEORÍAS SOBRE LA INCIDENCIA ELEVADA	46
I.6.1.2.- CLASIFICACIÓN MUTACIONAL POR FRECUENCIA	46
I.6.2.- AISLAMIENTO Y ESTRUCTURA DEL GEN CFTR	48

I.6.3.- LA PROTEÍNA CFTR	50
I.6.3.1.- ESTRUCTURA DE CFTR.....	50
I.6.3.2.- FUNCIONES DE CFTR	51
I.6.3.3.- CFTR EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA	52
I.6.4.- MUTACIONES EN EL GEN CFTR.....	53
I.6.5.- CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES	57
I.6.6.- CORRELACIONES GENOTIPO-FENOTIPO.....	59
I.6.7.- GENES MODIFICADORES.....	62
I.6.8.- INFORMACIÓN Y ASOCIACIONES	65

OBJETIVOS

II.1.- OBJETIVOS	69
-------------------------------	-----------

MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.- SECUENCIACIÓN DIRECTA DEL GEN CFTR.....	73
--	-----------

III.1.1.- METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE SECUENCIAS	73
III.1.1.1.- EXTRACCIÓN DEL ADN SANGUÍNEO	73
III.1.1.2.- CUANTIFICACIÓN DEL ADN TOTAL	74
III.1.1.3.- AMPLIFICACIÓN DEL ADN	75
III.1.1.4.- COMPROBACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO	80
III.1.1.5.- PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO	81
III.1.1.6.- REACCIÓN DE SECUENCIA	82
III.1.1.7.- PURIFICACIÓN PREVIA A LA SECUENCIACIÓN	84
III.1.1.8.- SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA.....	84

III.2.- ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA EL ANÁLISIS DEL GEN CFTR.....	86
---	-----------

III.2.1.- CHIPS DE ADN	86
III.2.2.- FUNDAMENTOS DE LA TECNOLOGÍA SEQUENOM MASSARRAY®	88
III.2.3.- SELECCIÓN DE LAS MUTACIONES.....	89
III.2.4.- UBICACIÓN DE LAS MUTACIONES	90
III.2.5.- METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE GENOTIPOS.....	92

III.2.5.1.- EXTRACCIÓN DEL ADN	93
III.2.5.2.- CUANTIFICACIÓN DEL ADN Y NORMALIZACIÓN	94
III.2.5.3.- AMPLIFICACIÓN DEL ADN	95
III.2.5.4.- TRATAMIENTO CON SAP	96
III.2.5.5.- REACCIÓN DE EXTENSIÓN	96
III.2.5.6.- HIBRIDACIÓN EN CHIP Y LECTURA.....	97
III.2.5.7.- ANÁLISIS DE DATOS.....	99

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1.- DESARROLLO DE UNA TECNOLOGÍA DE ALTO RENDIMIENTO PARA EL GENOTIPADO DE CFTR 103

IV.1.1.- DISEÑOS DE CHIPS-CFTR.....	103
IV.1.2.- MUTACIONES IDENTIFICADAS MEDIANTE CHIPS.....	107
IV.1.3.- UTILIZACIÓN DE CHIPS EN CRIBADO	109
IV.1.3.1.- MUTACIONES EN MUESTRAS DE CRIBADO	109
IV.1.3.2.- CASOS DIAGNOSTICADOS CON FIBROSIS QUÍSTICA MEDIANTE CHIPS EN CRIBADO	111

IV.2.- CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LOS CHIPS-CFTR 112

IV.2.1.- FLEXIBILIDAD.....	112
IV.2.2.- SENSIBILIDAD.....	113
IV.2.3.- COBERTURA	113
IV.2.4.- COSTE-EFECTIVIDAD.....	117
IV.2.5.- RAPIDEZ.....	118
IV.2.6.- EXACTITUD.....	119
IV.2.6.1.- CONTROLES DE CALIDAD.....	119
IV.2.6.2.- COMPROBACIÓN POR SECUENCIACIÓN	122
IV.2.7.- PROBLEMAS EN LOS GENOTIPADOS.....	122

IV.3.- ADECUACIÓN DE NUEVAS TECNOLOGÍAS A PROGRAMAS DE CRIBADO..... 125

IV.3.1.- ORIGEN DE LOS CHIPS Y PROTOCOLOS DE CRIBADO	125
IV.3.2.- RESULTADOS DE CRIBADO PREVIOS AL USO DE CHIPS.....	128

IV.3.3.- RESULTADOS GLOBALES DE CRIBADO EN PERÍODO 2003-2007.....	130
IV.3.3.1.- DESCRIPCIÓN DE CASOS DIAGNOSTICADOS CON FIBROSIS QUÍSTICA MEDIANTE EL PROGRAMA PILOTO DE CRIBADO.....	135

IV.4.- APÉNDICE 145

IV.4.1.- ESTUDIO MUTACIONAL DE PACIENTES GALLEGOS CON FIBROSIS QUÍSTICA.....	145
IV.4.1.- PUBLICACIÓN.....	151

CONCLUSIONES

V.1.- CONCLUSIONES 159

ANEXOS

ANEXO I.- <i>PRIMERS</i> DE AMPLIFICACIÓN Y EXTENSIÓN EN CHIP-CFTR VERSIÓN 2006.	163
ANEXO II.- <i>PRIMERS</i> DE AMPLIFICACIÓN Y EXTENSIÓN EN CHIP-CFTR VERSIÓN 2007.	165
ANEXO III.- EVOLUCIÓN EN LA COBERTURA DE LOS CHIPS.....	169

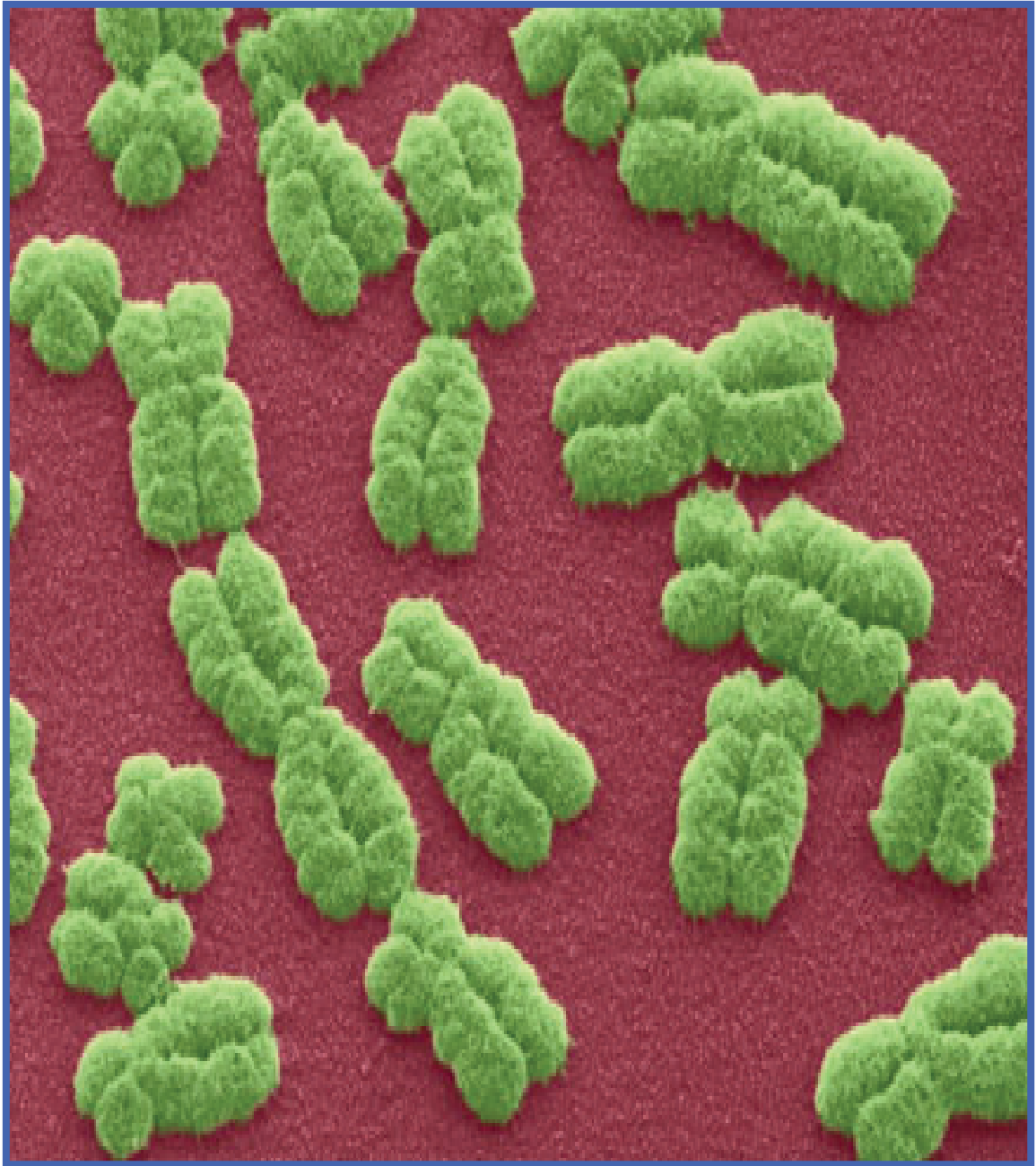
BIBLIOGRAFÍA

VII.1.- BIBLIOGRAFÍA 177

ABREVIATURAS

μL	Microlitros
μM	Micromolar
AAT	α1-antitripsina
ABC	<i>ATP-binding-cassette</i>
ACE	<i>Angiotensin 1 converting enzyme</i>
ACMG	<i>American College of Medical Genetics</i>
ACOG	<i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
Agua MQ	Agua milli-Q
AMPc	Adenosín monofosfato-3',5' cíclico
ATB0	<i>Neutral amino acid transporter B0</i>
ATP	Adenosín trifosfato
bp	<i>Base pairs</i> (pares de bases)
CBAVD	<i>Congenital bilateral absence of the vas deferens</i>
CDC	<i>Centre for disease control and prevention</i>
CeGen	Centro Nacional de Genotipado
CF	<i>Cystic Fibrosis</i>
CFGAC	<i>Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CHUS	Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela
CLC-2	<i>Chloride channel-2</i>
cms	Centímetros
Dr	Doctor
dNTP	Dinucleótidos trifosfato
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
ENaC	<i>Epithelial Sodium Channel</i>
FQ	Fibrosis Quística
GST M1	<i>Gluthation- S-transferase M1</i>
GST M3	<i>Gluthation- S-transferase M3</i>
GST P1	<i>Gluthation- S-transferase P1</i>
HFE	<i>Putative hereditary hemochromatosis gene</i>
HGMD	<i>Human Genome Mutation Database</i>
HLA-II	<i>Human leukocyte antigen gene II</i>
hME	<i>Homogenous Mass Extension</i>
IP	Insuficiencia pancreática
IRT	<i>Immunoreactive trypsinogen</i>
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
M	Molar
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry</i>
MBL	<i>Mannose-binding lectin</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
mEq/L	Milliequivalentes/litro
min	Minutos

mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NBD	<i>Nucleotide binding domain</i>
N.D.	No disponible
ng/mL	Nanogramos/mililitro
NHE3	<i>Sodium-hydrogen exchanger isoform 3</i>
NOS1	<i>Nitric oxide synthase- 1</i>
NOS3	<i>Nitric oxide synthase- 3</i>
°C	Grados centígrados
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
ORCC	<i>Outwardly rectifying chloride channel</i>
PAP	Proteína asociada a pancreatitis
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
ROMK	<i>Renal outer-medullary potassium channel</i>
rpm	Revoluciones por minuto
rs	<i>Reference SNP identification</i>
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
seg	Segundos
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SP	Suficiencia pancreática
Taq	<i>Thermus acuaticus</i>
TGF β 1	<i>Transforming growth factor-β1</i>
TIR	Tripsinógeno inmunorreactivo
TMD	<i>Transmembrane domain</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
TRPV4	<i>Transient receptor potential vanilloid 4</i>
U	Unidades de actividad enzimática
UV	Ultravioleta
β 2AR	<i>β2 adrenoreceptor</i>



INTRODUCCIÓN

I.1.- INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) es una de las enfermedades autosómicas recesivas graves más frecuentes en la población Caucásica. Su incidencia se sitúa en torno a 1 de cada 2500 nacidos. Son características comunes de esta enfermedad la patología respiratoria obstructiva, la insuficiencia pancreática, los problemas nutricionales y los problemas reproductivos.

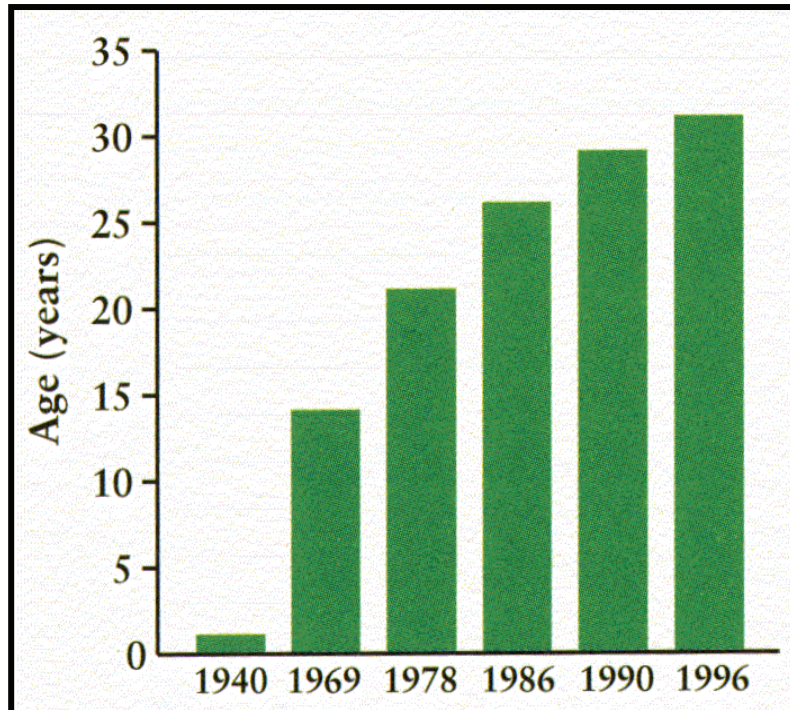
Su diagnóstico se basa principalmente en la detección de niveles altos de cloro en sudor y en la identificación de mutaciones en el gen CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*).

El gen causante de la fibrosis quística, gen CFTR, fue identificado mediante clonaje posicional en el año 1989 (Riordan JR *et al*), ubicándose en el brazo largo del cromosoma 7. El gen está formado por 27 exones con un tamaño de 250 kb que dan lugar a un mRNA de 6500 bp. El gen CFTR codifica para una proteína de 1480 aminoácidos, con un peso molecular de 168kDa. La función principal de esta proteína es la de actuar como canal de cloro estimulado por el AMPc (Cheng SH *et al*, 1991; Anderson MP *et al*, 1991A; Anderson MP, 1991B). Las células epiteliales de los pacientes con FQ tienen un transporte anormal de sodio y cloro.

La mutación más importante en el gen CFTR ($\Delta F508$) se corresponde con una delección de 3 pares de bases que da lugar a la pérdida de la fenilalanina en la posición 508 del gen (exón 10). Esta mutación se ha identificado en aproximadamente el 70% de los alelos de pacientes con FQ a nivel mundial (*Cystic Fibrosis Analysis Consortitum*, 1990). Actualmente se encuentran identificadas más de 1400 mutaciones que causan FQ (HGMD®-BIOBASE).

Durante los últimos años se ha producido una importante mejora en la calidad y esperanza de vida de los pacientes con FQ (Kerem E *et al*, 1992). Las últimas estimaciones indican una esperanza de vida próxima a los 40 años para un niño con FQ nacido en los años 90 (Elborn JS *et al*,

1991). Los principales factores que han contribuido a ello han sido la mejora en los tratamientos antibióticos, la fisioterapia respiratoria, el trasplante pulmonar y una mejor organización asistencial en centros médicos.



-EVOLUCIÓN DE LA ESPERANZA DE VIDA EN FIBROSIS QUÍSTICA.

I.2.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Mucho antes de que la FQ fuera reconocida por la medicina científica de la época, se conocía ya en los medios populares de algunas regiones del Centro y Norte de Europa, en donde se relacionaba el sudor salado de los bebés con su muerte prematura.

En relación a este sabor salado, se recoge en un manuscrito alemán del siglo XV, el *Codex Latinus Monacensis 849* (actualmente en la biblioteca estatal de Baviera), la bendición *Wider Elbe* contra las enfermedades de los niños encantados. Dicha bendición recomendaba lamer la nariz del niño encantado para comprobar si ésta tenía un sabor salado. Es la primera documentación escrita que relacionaba el sabor salado con una posible enfermedad.

Aproximadamente cien años más tarde (1606) aparece una descripción relacionada con el encantamiento de los niños y el sabor salado en la literatura médica de nuestro Siglo de Oro; el Dr Juan Alonso y de los Ruyzes de Fontecha, profesor de Medicina de la Universidad de Alcalá, en su libro *Diez privilegios para mujeres preñadas* dice: ... *conoce a la gente embrujada, si al rascarles en la frente, uno después nota un sabor salado en los dedos*

Probablemente la primera descripción histopatológica de la FQ se debe a Pieter Paaw (Holanda) que en 1595 realizó la autopsia a una niña de 11 años que se suponía estaba hechizada, concluyendo que la causa de la muerte había sido en realidad un problema pancreático.

Una de las primeras historias clínicas de la enfermedad fue elaborada por Georg Seger (Polonia) que describió en 1673 a una niña de 3 años cuya autopsia reveló un páncreas endurecido y cirroso tras haber observado síntomas de fiebre, vómitos, diarrea, dificultades para ganar peso e inanición prolongada. En 1677 Gerardus Blasisus (Holanda) observa un páncreas cirroso en un niño fallecido a los nueve años. En el siglo XVIII el

pediatra sueco Nils Rosen von Rosenstein (Uppsala) describe en su libro sobre enfermedades infantiles una enfermedad a la que denominó *fluxus coeliasus* y que cursaba con diarrea, distrofia, debilidad y páncreas endurecido. Probablemente se trataba de enfermos con FQ.

En 1838 el vienés Carl von Rokitansky (Austria), tras una autopsia realizada a un feto humano que había nacido en el séptimo mes de embarazo sin dar señales de vida, descubrió lo que debía ser un íleo meconial (obstrucción intestinal total o parcial de la luz del tracto gastrointestinal). Alois Bednar, también en Viena, describe en 1850 un caso similar de un recién nacido vivo que había muerto al sexto día de vida. Más o menos coincidentes en el tiempo se describen y publican cuadros semejantes en Inglaterra.

En 1936 Guido Fanconi (Suiza) establece una relación entre la afectación pancreática y las bronquiectasias como elementos característicos de la FQ (Fanconi G *et al*, 1936) aunque el término fibrosis quística (del páncreas) no aparece hasta 1938 cuando la patóloga estadounidense Dorothy H. Anderson en autopsias de lactantes y niños da una descripción comprensible de los síntomas de la FQ y de daños en órganos que siempre incluían la destrucción del páncreas y frecuentemente infección y daño en el parénquima pulmonar (Anderson DH *et al*, 1938).

En el año 1943, Farber fue quien, al parecer, acuña el término de *mucoviscidosis* para referirse a la patología que nos ocupa, en la que los sistemas ductales de los órganos afectados acababan generalmente siendo ocluidos por secreciones inusualmente espesas (Farber D *et al*, 1944). Hacia 1946 los estudios de los pacientes comenzaron a revelar información sobre las bases genéticas de la FQ. Después de examinar el patrón de herencia en las familias Anderson y Hodges dedujeron que se trataba de una condición recesiva, probablemente causada por una mutación en un único gen (monogénica) (Anderson DH y Hodges RG, 1946).

En 1953, tras una ola de calor en Nueva York, Paul A. Di Sant'Agnese observa la excesiva pérdida de sal en el sudor en los pacientes con FQ (Di

Sant'Agnese PA *et al*, 1953). Esta observación serviría para desarrollar un test clásico en el diagnóstico de la FQ, la medición del contenido de cloruro en el sudor por estimulación mediante iontoforesis de pilocarpina (Gibson LE y Cooke RE, 1959).

El patrón de herencia autosómico recesivo de la FQ fue definitivamente indicado por Allen en 1956 (Allen F Jr. *et al*, 1956) y confirmado por Conneally en 1973 (Conneally PM *et al*, 1973).

La primera referencia a la FQ recogida en Anales Españoles de Pediatría la encontramos en una conferencia celebrada el 15 de febrero de 1969 en el Colegio de Médicos de Palma de Mallorca con el tema *Mucoviscidosis*.

En los años 80 los científicos descubren que el mal funcionamiento de los tejidos epiteliales (impermeabilidad al ion cloruro) era un defecto común a todos los órganos afectados por la FQ (Knowles M *et al*, 1981; Quinton PM *et al*, 1983).

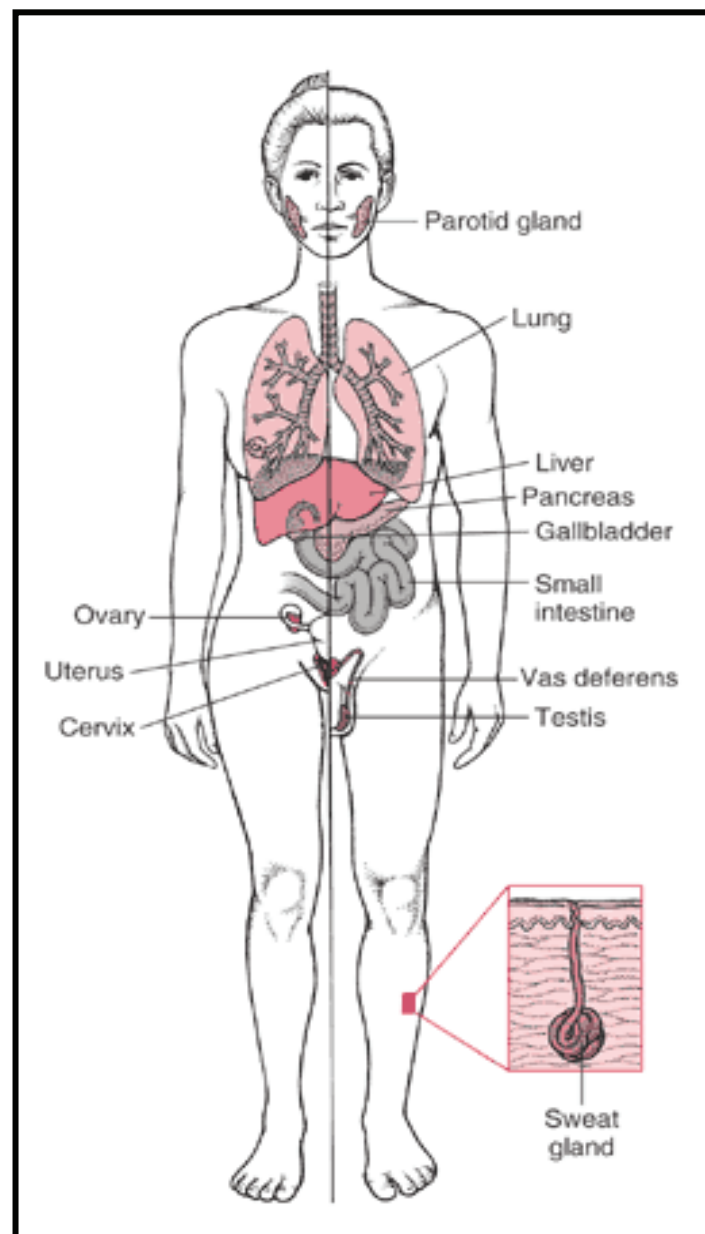
En 1985 se localiza el gen en el cromosoma 7 y a finales de esta misma década se identifica definitivamente el gen CFTR mediante clonaje posicional por parte de Lap-Chee Tsui y John Riordan junto con Francis S. Collins y colaboradores (Riordan JR *et al*, 1989; Rommens JM *et al*, 1989; Kerem B *et al*, 1989).

FUENTE: www.fibrosis.org/comunica/congreso/articles/M_histo.htm.

Fecha de acceso mayo 2008 (Pérez Frías J *et al*).

I.3.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Una de las características más importantes de la fibrosis quística es su gran variabilidad. La FQ afecta a los epitelios de diferentes órganos dando lugar a un amplio abanico de manifestaciones clínicas. En el siguiente esquema se pueden observar los diferentes órganos que pueden estar afectados en un paciente con FQ.



-ÓRGANOS AFECTADOS EN LA FIBROSIS QUÍSTICA.

I.3.1.- PATOLOGÍA RESPIRATORIA

La manifestación clínica respiratoria más frecuente en la FQ suele ser la obstrucción de las vías aéreas debido a la acumulación de moco que generalmente da lugar a infección al producirse su colonización por bacterias oportunistas. Éstas suelen jugar el papel más importante para el agravamiento de la enfermedad pulmonar. Son frecuentes infecciones bacterianas por *Burkholderia cepacia*, *Haemophilus influenzae* o *Staphylococcus aureus* que generalmente se cronifican cuando aparece *Pseudomonas aeruginosa*, difícil de erradicar a pesar de la terapia antibiótica existente. El modo exacto por el que se adquieren estas bacterias todavía no se conoce con exactitud habiéndose sugerido la posibilidad de contagio entre pacientes (Kelly NM *et al*, 1982).



-PULMONES CON ACUMULACIONES DE MOCO EN UN PACIENTE CON FQ.

Los hongos y las micobacterias son otros microorganismos que también pueden colonizar las vías aéreas de los pacientes con FQ. En la mitad de los pacientes afectados con la enfermedad se pueden aislar hongos procedentes del esputo siendo *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* los que aparecen con mayor frecuencia. También se han encontrado en algunos pacientes micobacterias no tuberculosas que suelen

dar lugar a una infección pulmonar semejante a la tuberculosis que produce *Mycobacterium tuberculosis*.

Son comunes en los pacientes con FQ las complicaciones respiratorias como la aspergilosis broncopulmonar alérgica, la neumonía y la insuficiencia respiratoria. Los problemas respiratorios son la causa de la muerte en el 90% de afectados con fibrosis quística.

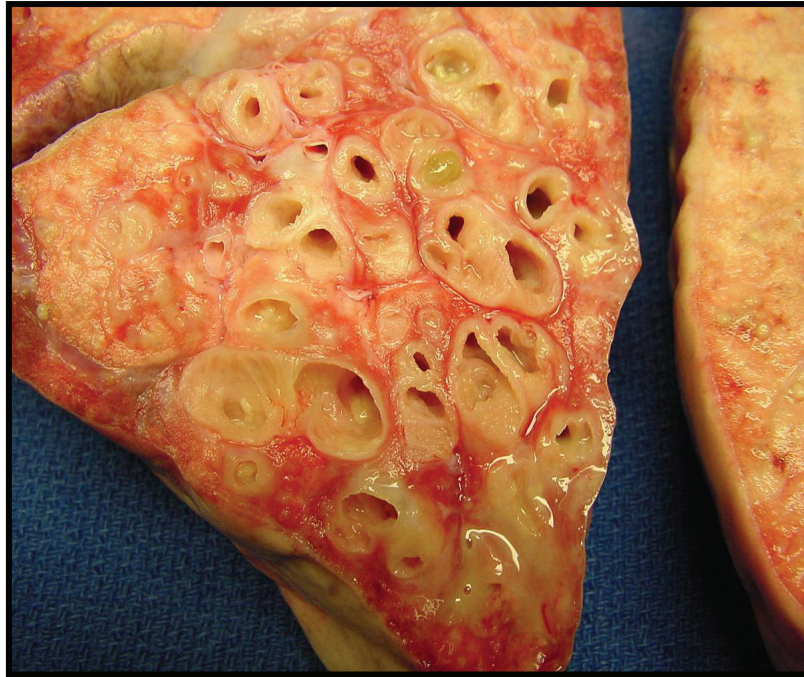
I.3.2.- PATOLOGÍA DIGESTIVA

Las lesiones pancreáticas y los problemas gastrointestinales fueron los primeros síntomas conocidos de la FQ y constituían los criterios más importantes para el diagnóstico hasta que se descubrieron los niveles elevados de cloruro en el sudor.

La importancia de la afectación al páncreas queda de manifiesto en la primera descripción de la patóloga de la Universidad de Columbia D.H. Anderson que denomina a la enfermedad *fibrosis quística del páncreas* (Anderson DH *et al*, 1938).

Aproximadamente el 10-15% de los neonatos con FQ presenta en el momento del nacimiento íleo meconial, que suele ser diagnóstico de la enfermedad (Littlewood JM *et al*, 1992). En los pacientes con FQ se produce una hiperplasia epitelial y una acumulación de moco en las criptas intestinales debido a los problemas en la digestión de alimentos por carencia de enzimas pancreáticas.

El 85% de los pacientes con FQ tiene insuficiencia pancreática (IP), que es desarrollada generalmente durante el primer año de vida (Waters DL *et al*, 1990). Los pacientes con IP muestran una obstrucción en los conductos secretores que da lugar, como se puede ver en la imagen siguiente, a la formación de quistes y a destrucción tisular.



-PÁNCREAS DE UN PACIENTE AFECTADO CON FQ.

El 15% de pacientes restante no desarrolla IP o se produce a edades avanzadas (Welsh MJ *et al*, 2001). Estudios del gen CFTR han permitido postular la relación de cierto tipo de mutaciones con la insuficiencia pancreática (Sheppard DN *et al*, 1993; Choi JY *et al*, 2001). Este aspecto será tratado más adelante en el apartado correlaciones genotipo-fenotipo.

Respecto a los problemas hepáticos, éstos se han relacionado con la obstrucción de los conductos biliares (cirrosis biliar) debido a las secreciones biliares espesas. No se sabe con exactitud las razones que hacen que ciertos pacientes con FQ padezcan enfermedad hepática y otros no. Aunque generalmente la patología hepática se encuentra asociada a IP, se han descrito casos en los que es compatible con suficiencia pancreática (SP) (Waters DL *et al*, 1995).

I.3.3.- PATOLOGÍA REPRODUCTIVA

Aproximadamente el 98% de los pacientes masculinos con FQ son infértiles debido a la malformación de estructuras derivadas de los conductos de Wolff (Wilschanski M *et al*, 1996). En estos pacientes la

infertilidad es debida a la ausencia de espermatozoides (azoospermia) debida a la agenesia o atrofia de los conductos deferentes o el epidídimo. La primera descripción de infertilidad masculina en un paciente con FQ data del año 1968, cuando se describe la ausencia bilateral de los conductos deferentes y el desarrollo incompleto del epidídimo en un paciente de 31 años (Kaplan E *et al*, 1968).

En estudios sobre la ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes (CBAVD) se observó que muchos pacientes eran portadores de mutaciones en el gen CFTR (Mercier B *et al*, 1995). Pacientes con formas suaves de FQ muestran esta agenesia congénita como su única manifestación clínica. Concretamente es destacable el caso de la mutación R117H que, en pacientes con CBAVD, se encuentra frecuentemente en trans junto a la variante 5T del intrón 8 (Chu CS *et al*, 1993; Kieseewetter S *et al*, 1993).

En las mujeres con FQ el tracto reproductivo es normal pero suelen mostrar una fertilidad disminuída por falta de ovulación debida a problemas nutricionales y respiratorios. Por otro lado, el moco cervical escaso y espeso de estas mujeres dificulta la migración de espermatozoides (Kopito LE *et al*, 1973; Kotloff RM *et al*, 1992). El efecto del embarazo en mujeres con FQ ha sido estudiado concluyendo que no implica un aumento en el riesgo de muerte (curiosamente hubo una mayor supervivencia frente al grupo de mujeres control no embarazadas con FQ) (Goss CH *et al*, 2003).

I.3.4.- PATOLOGÍA NUTRICIONAL

Los problemas relacionados con la malnutrición son frecuentes en los niños con fibrosis quística. La malabsorción de nutrientes suele deberse al déficit de enzimas pancreáticas lo cual da lugar a una digestión fallida de proteínas y grasas que conducen a una carencia vitamínica, especialmente de las vitaminas liposolubles A, D, E y K (Welsh MJ *et al*, 2001; Wilson DC y Pencharz PB, 1998) lo cual repercute en un retraso en el crecimiento del

niño. Los recién nacidos con FQ tienen al nacer un peso medio inferior al correspondiente en ambos sexos.

Otra situación que da lugar a alteraciones nutricionales es la coexistencia de diabetes *mellitus* por deficiencia de insulina que aparece en un 5% de los pacientes con FQ. Por otro lado, hay que destacar que la deshidratación también representa un problema frecuente y grave en los pacientes con FQ y que debe ser controlada adecuadamente. Todo ello hace que sea necesario un seguimiento intensivo del estado nutricional y de los requerimientos específicos de los pacientes con FQ.

I.4.- TRATAMIENTO

Actualmente no existe una cura para la FQ. El tratamiento consiste en reducir los síntomas y disminuir el progreso de la enfermedad para que la calidad de vida del paciente sea mejor. La utilización de enzimas pancreáticas en los pacientes con insuficiencia pancreática, una nutrición adecuada, la limpieza mecánica de las secreciones purulentas del tracto respiratorio inferior y el tratamiento antibiótico enérgico de las exacerbaciones pulmonares constituyen las bases del tratamiento de la FQ. Otras terapias adyuvantes son los broncodilatadores, la terapia antiinflamatoria (ibuprofeno, corticoides), DNasa y las soluciones salinas hipertónicas. El trasplante pulmonar es la última opción terapéutica en pacientes con enfermedad pulmonar crónica incompatible con la supervivencia a pesar de haber recibido un tratamiento médico intensivo.

En los últimos años ha existido un gran esfuerzo investigador en la búsqueda de una terapia curativa contra la fibrosis quística. Actualmente el grupo de Eitan Kerem tiene en fase II de ensayos clínicos una prometedora molécula (PTC 124) que palía los efectos de las mutaciones que dan lugar a codones prematuros de parada (W1282X, G542X...) abriendo así una puerta a la curación de los pacientes con este tipo de mutaciones (Kerem E, 2008). Otra molécula en fase II de ensayos clínicos es la VX-770 de la compañía

americana *Vertex Pharmaceuticals* que ha mostrado buenos resultados para los pacientes con la mutación G551D. Por otro lado grupos de investigación como el de Alan Verkman llevan años desarrollando numerosas moléculas sin que todavía hayan llegado al uso en clínica (Verkman A, 2008).

Otras opciones como la terapia intracelular y la terapia génica están también en fase de investigación. La FQ es un primer candidato a la terapia génica por su relativa accesibilidad a los órganos diana cruciales, es decir, los pulmones. Estudios de transferencia génica llevados a cabo utilizando adenovirus y complejos ADNc-FQ liposomales han logrado la restauración de cloruro en los ratones FQ transgénicos. Varios ensayos clínicos han sido realizados en pequeños grupos voluntarios de pacientes con FQ. Aunque existe evidencia experimental de la expresión de CFTR en los pacientes con FQ tratados, ha sido generalmente transitoria y existen varias descripciones de reacciones inflamatorias, especialmente cuando se utilizan adenovirus como vectores. A pesar de los problemas encontrados inicialmente, existe un notable optimismo de que se desarrollará una terapia génica efectiva para la FQ en los próximos años (Parsons DW *et al*, 2005).

I.5.- DIAGNÓSTICO

I.5.1.- DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Hasta hace poco tiempo, el diagnóstico de la fibrosis quística se había basado en criterios clínicos definidos detalladamente y el análisis de los niveles de cloruro en sudor (Davis PB *et al*, 1996). La disponibilidad desde los años 90 del análisis mutacional del locus del gen responsable de la enfermedad (*Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium-CFGAC*, 1994) y la valoración de las propiedades bioeléctricas del epitelio respiratorio mediante la medida de la diferencia de potencial nasal transepitelial (Knowles MR *et al*, 1995) han aumentado el espectro clínico de la FQ al incluir a individuos con presentaciones atípicas y menos severas de la enfermedad.

Para orientar en el diagnóstico de este trastorno genético, un grupo de expertos clínicos y genetistas en el año 1997 se reunió a través de la *Cystic Fibrosis Foundation* para consensuar criterios para el diagnóstico de la enfermedad (Rosenstein BJ y Cutting GR, 1998). Así, concluyeron que el criterio diagnóstico para la FQ debería incluir la presencia de una o más características fenotípicas, una historia de FQ en un hermano o un resultado positivo en un test de cribado neonatal (además de evidencia en laboratorio de una anomalía en CFTR documentada por una elevada concentración de cloruro en sudor, la identificación de mutaciones en los alelos del gen CFTR o anomalías en el transporte de iones en el epitelio nasal).

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

- Uno o más rasgos fenotípicos característicos.
- Historia de fibrosis quística en hermano o primo hermano.
- Cribado neonatal positivo.

Evidencia de disfunción en CFTR demostrada por:

- Concentración de cloruro en sudor elevada en dos o más ocasiones.
- Identificación de dos mutaciones causantes de la enfermedad.
- Diferencia de potencial nasal anormal.

CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE FQ

- Enfermedad crónica sinopulmonar manifestada por:

- a) Colonización o infección persistente con patógenos típicos de FQ, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*.
- b) Tos crónica y producción de esputo.
- c) Anormalidades persistentes en radiografía torácica (bronquiectasias, atelectasias...).
- d) Obstrucción de las vías aéreas manifestada en dificultad respiratoria o sibilancias.
- e) Poliposis nasal; anormalidades radiográficas o de tomografía computerizada de los senos paranasales.
- f) Dedos en palillo de tambor.

- Problemas gastrointestinales y nutricionales incluyendo:

- a) Intestinales: íleo meconial, síndrome de obstrucción intestinal distal, prolapso rectal.
- b) Pancreáticos: insuficiencia pancreática, pancreatitis recurrente.
- c) Hepáticos: enfermedad hepática crónica manifestada por evidencia clínica o histológica de cirrosis biliar focal o cirrosis multilobular.
- d) Nutricionales: problemas de crecimiento (malnutrición proteico-calórica), hipoproteinemia y edema, complicaciones secundarias a la deficiencia de vitaminas liposolubles.

- Síndromes de falta de sal: pérdida aguda de sal, alcalosis metabólica crónica.

- Anormalidades urogenitales masculinas resultantes en azoospermia obstructiva (CBAVD).

TEST DEL SUDOR

El test del sudor (Stern RC, 1997) sigue siendo el test de laboratorio más utilizado para confirmar la FQ. El test se basa en la recogida de sudor mediante iontoforesis por pilocarpina con la determinación química de la concentración de los cloruros. Por lo general, un nivel de cloruros en el sudor de más de 70 mEq/L en dos medidas diferentes se considera diagnóstico.

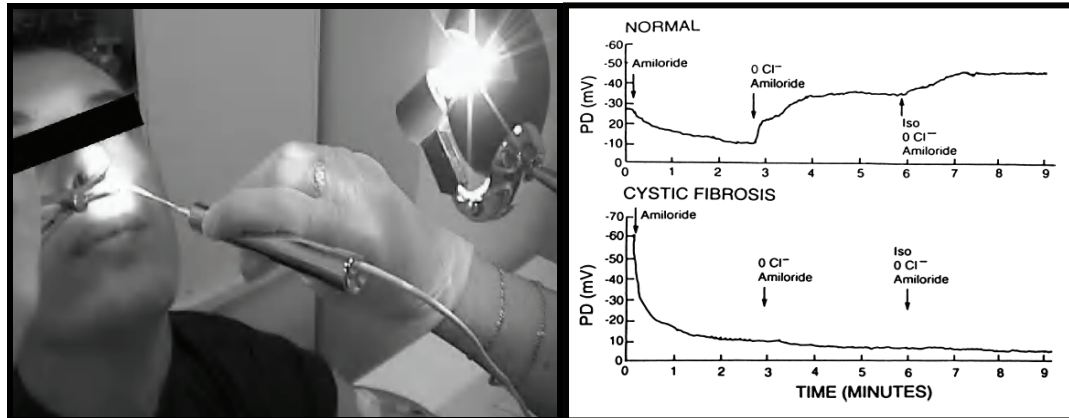


-DISPOSITIVO PARA LA REALIZACIÓN DEL TEST DEL SUDOR.

MEDIDA DE LA DIFERENCIA DE POTENCIAL NASAL

El epitelio respiratorio, como los tejidos epiteliales en otros órganos, regula el contenido de iones y agua de los fluidos superficiales mediante mecanismos de transporte activo. Estos movimientos iónicos crean una diferencia de potencial transeptelial. La ausencia de CFTR en la superficie apical, el flujo disminuído de cloruros resultante y la hiperabsorción de sodio dan lugar a unas medidas anormales de la diferencia de potencial a través del epitelio de los individuos con FQ. Debido a la accesibilidad del tejido epitelial nasal, el distinto patrón de diferencias de potencial nasal tomado en pacientes con FQ se encuentra bien establecido (Knowles MR *et al*,

1995). La diferencia de potencial nasal ha sido aceptada como un test diagnóstico alternativo, que puede complementar el uso del test del sudor y el análisis mutacional. Este test es más útil en pacientes con presentaciones atípicas con niveles de test del sudor *borderline* (40-70 mEq/L) y en los que no se han identificado dos mutaciones asociadas a la FQ (Wilson DC *et al*, 1998).



-MEDIDA DE LA DIFERENCIA DE POTENCIAL NASAL.

1.5.2.- DIAGNÓSTICO MOLECULAR

El test genético para la FQ generalmente se realiza para respaldar una evaluación clínica o para estudiar a un individuo que tiene un riesgo incrementado de portar un alelo de FQ.

La identificación de portadores se lleva a cabo generalmente para valorar el riesgo de la transmisión de mutaciones a la descendencia. Individuos con una historia familiar de FQ tienen un mayor riesgo de ser portadores de mutaciones en el gen CFTR que el resto de la población, por lo cual pueden desear un test mutacional para definir con mayor exactitud su riesgo.

El diagnóstico prenatal se lleva a cabo generalmente en parejas cuyos miembros son portadores y que por lo tanto tienen un riesgo del 25% de tener hijos con FQ. El análisis mutacional de ambos padres y el feto puede

determinar si el feto ha heredado un genotipo de riesgo. El consejo genético puede resultar complicado para genotipos asociados a formas atípicas de FQ.

Por otro lado, el actual desarrollo de tratamientos específicos para pacientes con fibrosis quística con determinadas mutaciones (codones de parada, G551D) repercutirá en la necesidad del análisis genético de los mismos para la selección de su terapia.

I.5.3.- CRIBADO NEONATAL PARA LA FIBROSIS QUÍSTICA

I.5.3.1.- FUNDAMENTO

Aunque la FQ generalmente causa signos y síntomas característicos durante la infancia (Lai HC *et al*, 2002; Abman SH *et al*, 1991), los retrasos en el diagnóstico son comunes (Lai HC *et al*, 1998) y muy perjudiciales. Cuando se diagnostica por los métodos tradicionales, basándose en la sospecha por síntomas clínicos y un test del sudor, casi la mitad de los pacientes tiene ya malnutrición severa y muchos tienen infección crónica respiratoria (*Cystic Fibrosis Foundation*, 2001; Farrell PM, 2003).

Numerosos estudios han demostrado en los últimos años los múltiples beneficios de un diagnóstico temprano de la enfermedad, tanto en la evolución clínica como en la reducción de la morbilidad. La evidencia sugiere que un diagnóstico presintomático temprano de la FQ a través de los programas de cribado neonatal está asociado a beneficios clínicos y para la salud del paciente (Farrell PM *et al*, 1997; Waters DL *et al*, 1999; Farrell PM *et al*, 2001; Mastella G *et al*, 2001; Siret D *et al*, 2003; Sims EJ *et al*, 2005; Farrell PM *et al*, 2003).

Las expectativas para los niños nacidos con FQ han cambiado mucho en las últimas dos décadas. Un informe reciente sugiere unas mejores

funciones cognitivas en estos niños, con mejores niveles de vitamina E al diagnóstico (Koscik RL *et al*, 2005). Además, el cribado neonatal reduce la exposición de las familias a lo que frecuentemente constituye un período largo y estresante de diagnóstico y les proporciona a las parejas la oportunidad de tomar decisiones informadas sobre su reproducción (Merelle ME *et al*, 2003; Kharrazi M *et al*, 2005). El consenso general es que existe suficiente evidencia para apoyar el cribado neonatal en FQ y, según revisiones sistemáticas: *...los beneficios en la salud en los niños con FQ compensan el riesgo de daño y justifican el screening de FQ...* (Farell PM *et al*, 2005).

El seguimiento de los niños identificados mediante programas de cribado ha suministrado importante información sobre la historia natural de la enfermedad así como un mejor entendimiento de su fisiopatología temprana. La mayoría de los niños tienen síntomas gastrointestinales en el momento del diagnóstico (Giglio L *et al*, 1997). El crecimiento reducido puede apreciarse a los dos meses de edad. Aproximadamente un 60% de los niños tiene una significativa malabsorción de grasas a esa edad y el grado de malabsorción se correlaciona con la falta de crecimiento (Bronstein MN *et al*, 1992). No sorprende por tanto que los niños con FQ diagnosticada convencionalmente tengan severas deficiencias vitamínicas o malnutrición proteica, conllevando deshidratación e hipoproteinemia (Wilfond BS *et al*, 1994). Adicionalmente a los problemas nutricionales, los niños con FQ identificada a través de programas de cribado tienen evidencias de infección en las vías aéreas e inflamación, sugiriendo que la enfermedad pulmonar en estos niños es similar a la de adultos y niños de mayor edad (Armstrong DS *et al*, 1995). Todos estos problemas tempranos sugieren de una manera importante la necesidad de un tratamiento precoz.

En la tabla siguiente se pueden observar resumidas las ventajas que fundamentan el diagnóstico temprano mediante el cribado neonatal (Farrell PM, 2008):

FUNDAMENTOS NUTRICIONALES Y GASTROINTESTINALES

- Los pacientes con FQ son generalmente bien alimentados desde el momento del nacimiento.
- En el 90% de los pacientes se producirá insuficiencia pancreática cerca del primer año de vida.
- En el 50 % de los pacientes no tratados se desarrollará malnutrición severa.
- La IP puede ser anticipada y la malnutrición prevenida.
- Los beneficios a largo plazo de una nutrición adecuada son significativos.

FUNDAMENTOS PULMONARES

- Los pulmones de los afectados con FQ son generalmente sanos al nacer, aunque por poco tiempo.
- La enfermedad pulmonar frecuentemente se produce a los 2 meses de vida.
- La colonización por *Pseudomonas aeruginosa* ocurrirá aproximadamente en un tercio de los pacientes no diagnosticados.
- La conversión de *P. aeruginosa* al tipo mucoide supone un alto riesgo a largo plazo para los niños con FQ.

OTROS FUNDAMENTOS

- El daño psicológico asociado a la *odisea en el diagnóstico* puede prevenirse.
- Los padres pueden tomar decisiones informadas para futuros embarazos.
- Beneficios económicos tanto para el diagnóstico como para el tratamiento.
- Se favorece la investigación clínica, especialmente el estudio de estrategias preventivas.

En esencia, excepto los pacientes con íleo meconial, los niños con FQ están generalmente *sanos* en el momento del nacimiento. Su estado nutricional es normal y el 90 % de los casos con mutaciones de las clases I, II y III (que serán descritas posteriormente) desarrollarán IP que puede ser anticipada utilizando terapias que prevengan la malnutrición. De este modo es bastante probable que crezcan de una manera normal (Farrel PM *et al*, 2001; Roussey M *et al*, 2003).

Los fundamentos pulmonares para el cribado son claros. Afortunadamente, los pulmones de pacientes con FQ al nacimiento son normales (Bedrossian CWM *et al*, 1976), aunque esta situación suele no continuar después de los 2 meses de edad (Abman SH *et al*, 1991; Farrell PM *et al*, 2003b). Existen muy pocos pacientes diagnosticados a través de cribado neonatal que mostraran *Pseudomonas aeruginosa* en su tracto respiratorio, mientras que aproximadamente un tercio de los pacientes diagnosticados tras los signos o síntomas ya están colonizados con *P. aeruginosa* y muchos con el tipo mucoide (FitzSimmons SC, 1993).

Adicionalmente a los fundamentos clínicos, existen otras consideraciones a tener en cuenta. Además de los riesgos a corto plazo debidos al diagnóstico retardado, sabemos que existen otras complicaciones a largo plazo entre las que se incluyen fallo en el desarrollo de la función cognitiva (Koscik RL *et al*, 2004) y un riesgo aumentado de enfermedad pulmonar temprana (Rosenfeld M, 2005).

Por otro lado, también existe evidencia de las implicaciones económicas y coste-efectividad de los programas de cribado neonatal en FQ. En un estudio pionero reciente (Sims EJ *et al*, 2007) se concluye que, además de los evidentes beneficios clínicos y sociales de los programas de cribado neonatal, existe un beneficio económico traducido en un ahorro importante para los sistemas de salud.

I.5.3.2.- APROXIMACIONES ACTUALES

Casi todos los programas de cribado neonatal para la FQ comienzan con la determinación de tripsinógeno inmunoreactivo (TIR) (Crossley JR *et al*, 1981), un marcador de disfunción pancreática, de una mancha de sangre recogida a los pocos días del nacimiento (Wilcken B *et al*, 1993). Sin embargo, un nivel elevado de TIR tras el nacimiento no es específico de la FQ, ya que muchos niños sanos pueden mostrar elevaciones temporales transitorias por diversos motivos. Tras la introducción de este marcador en los programas de cribado se hizo evidente que los niños con FQ tenían elevaciones persistentes en los niveles de TIR, razón por la cual la mayoría de los programas de cribado introdujeron una segunda medida de TIR a las pocas semanas de edad aumentando así la especificidad del método.

Un gran número de programas de cribado en el mundo han demostrado que mediante la medida de dos niveles de TIR, acompañado con un test de sudor, se puede conseguir una sensibilidad en la población a estudio próxima al 95%.

La aproximación TIR/TIR identifica tanto a niños con suficiencia pancreática como con insuficiencia pancreática. Curiosamente, niños con íleo meconial tienen frecuentemente valores debajo del umbral para TIR elevado. Este hecho no es clínicamente importante ya que casi todos estos pacientes son identificados de manera temprana tras el nacimiento y por lo tanto no son la meta del cribado. También se comprobó en los programas de cribado que los tests de sudor se realizan con facilidad en la gran mayoría de recién nacidos después de una semana de edad, eliminando la idea de que este test no se podía realizar hasta que hubiesen transcurrido meses del nacimiento (Farrell PM y Kosciak RE, 1996).

Hay dos problemas importantes asociados a la aproximación de doble TIR. La elevada tasa de falsos positivos en la primera muestra da lugar a ansiedad en una gran cantidad de padres de neonatos que no tienen verdaderamente FQ. Además, el tiempo que transcurre hasta que se reciben los resultados de una segunda medida de TIR puede dar lugar a un angustioso período de incertidumbre.

La incorporación del análisis mutacional en los programas de cribado neonatal para la FQ se introduce para intentar resolver estos dos problemas principales de la aproximación mediante doble medida de TIR y hoy en día se ha incorporado en la mayoría de los programas (Gregg RG *et al*, 1997). La mayor parte de los programas europeos (cerca del 70%) usan análisis de ADN como segundo paso siguiendo a la medida de niveles elevados de TIR (Southern KW *et al*, 2007).

Con esta aproximación los pacientes se identifican a través de niveles elevados de TIR y posteriormente se les realiza un análisis mutacional en la misma mancha de sangre. Si a los niños se les encuentran dos mutaciones en el gen CFTR entonces el diagnóstico se suele realizar respaldado por un test del sudor. Si el niño es portador de una única mutación, entonces se necesita el test del sudor para el diagnóstico. Si no se detectan mutaciones, se supone que el niño no tiene FQ. La sensibilidad de esta aproximación depende de la frecuencia de mutaciones en una población dada y del número de mutaciones estudiadas. En poblaciones en las que la incidencia

de la mutación $\Delta F508$ es mayor al 70% de los alelos, se consiguen sensibilidades mayores al 90% estudiando únicamente esta mutación. Otros programas han mejorado la sensibilidad añadiendo un panel con diferentes mutaciones (Castellani C *et al*, 1997).

Hay dos problemas principales en la aproximación TIR/ADN. Uno es la obligada tasa de falsos negativos que aparece debido al limitado número de mutaciones estudiadas. El segundo es que los individuos portadores frecuentemente muestran hipertripsinemia (Castellani *et al*, 2005). De hecho el test TIR/ADN detecta portadores en una proporción 3 veces superior a la que detecta niños con FQ, aumentando enormemente la necesidad de consejo genético como parte del programa de cribado. Muchos de estos programas ven la detección de portadores como un *efecto secundario* del cribado TIR/ADN.

Otras aproximaciones sugeridas para el cribado en áreas con una alta heterogeneidad alélica han sido el uso de la lactasa meconial como test adicional para mejorar la estrategia TIR/ADN o el uso de la proteína asociada a la pancreatitis (PAP) seguida de un test TIR para las muestras con niveles elevados de PAP. Ninguna de estas aproximaciones se ha utilizado fuera de las regiones donde fueron desarrolladas (Wilcken B, 2007).

Ha existido preocupación de que el cribado neonatal conllevara daño psicológico para las familias de los niños falsos positivos pero la evidencia demuestra que los efectos psicológicos del cribado no causan problemas de importancia (Baroni MA *et al*, 1997).

I.5.3.3.- PROGRAMAS DE CRIBADO NEONATAL EN EL MUNDO

El cribado para FQ se lleva a cabo actualmente de manera universal en Australia, Nueva Zelanda y en 27 de los 51 estados de EEUU (con el cribado parcial o el proyecto de su futura realización en otros 7) (Wilcken B, 2007).

En Europa existen programas de cribado neonatal en Francia, Polonia, Austria, República Checa, Gran Bretaña e Italia (12 programas regionales) (Southern KW *et al*, 2007).

En España existen programas de cribado regionales para la fibrosis quística únicamente en Castilla y León, Cataluña, Baleares, Extremadura, Aragón, Galicia y, próximamente, en Madrid. Cada uno de ellos, aunque semejante, tiene diferentes protocolos y algoritmos para el diagnóstico.

I.6.- GENÉTICA

I.6.1.- EPIDEMIOLOGÍA DE LA FIBROSIS QUÍSTICA

La fibrosis quística (OMIM#219700) se ha descrito tradicionalmente como uno de las enfermedades heredadas graves más comunes en Caucásicos. Los estudios epidemiológicos retrospectivos indican una frecuencia de FQ en la mayoría de las poblaciones europeas comprendida entre 1 de cada 2000 y 1 de cada 4000 nacimientos (Welsh MJ *et al* 2001).

PAIS	INCIDENCIA
CAUCÁSICOS	
Australia	1/2450; 1/2550
Checoslovaquia	1/2800; 1/3300
Bretaña francesa	1/1800
Inglaterra	1/2500; 1/3000
Alemania	1/3300
Israel	1/5000
Italia	1/4700
México	1/8000; 1/9000
Irlanda	1/1700; 1/1900
Sudáfrica	1/6500
Suecia	1/7700
Estados Unidos	1/1900; 1/3700
Albania	1/450
Suiza	1/2000

Holanda	1/3600
Francia	1/4000
Estonia	1/4500
Dinamarca	1/4700
Noruega	1/6500
Finlandia	1/25000
MEZCLA POBLACIONAL	
Asiáticos-ingleses	1/10000
Afroamericanos	1/15000; 1/12000
NO CAUCÁSICOS	
Asiáticos (Hawaii)	1/90000
Asiáticos (Japón)	1/323000

-INCIDENCIA DE LA FIBROSIS QUÍSTICA EN DISTINTAS POBLACIONES.

Como se puede observar, las incidencias más altas se encuentran en países de Europa Central (Suiza 1/2000, República Checa 1/2800) (Hergersberg M *et al*, 1997; Macek M Jr *et al*, 2001) y en el Reino Unido (Irlanda 1/1700, Inglaterra 1/2500) (Cashman SM *et al*, 1995; Schwarz MJ *et al*, 1995). La incidencia más elevada la encontramos en Albania con 1/450 (Festini F *et al*, 2003).

En el sur de Europa, se estima una incidencia de 1 en 4000-5000 (Francia 1/4000, Italia 1/4700) (Claustres M *et al*, 2000; Bossi A *et al*, 1999). De los países europeos, Finlandia es el que presenta menor incidencia con 1/25000 (Kere J *et al*, 1994).

Una mayor incidencia de FQ aparece en ciertos grupos como la población de origen celta de la Bretaña francesa (1/377), *Afrikaners* viviendo en el sudoeste de África (1/622) y Franco-canadienses de la región

canadiense de Sauguenay-Lac St Jean (Bois E *et al*, 1978; Rozen R *et al*, 1990; Super M *et al*, 1975). Presumiblemente, la deriva genética y/o un efecto fundador son las responsables de la alta incidencia en estas regiones.

En las poblaciones nativas de África, América y Asia existe poca documentación sobre la incidencia de la enfermedad, aunque se cree que es mucho menor, del orden de 1/10000-1/17000 (Devoto M *et al*, 1991; Bowler IM *et al*, 1993). Los datos existentes de la enfermedad provienen de estudios con pocos pacientes (Bowler IM *et al*, 1993; Grove SS *et al*, 1959; Levin SE *et al*, 1967; MacDougall LG *et al*, 1962; Senecal JJ *et al*, 1954). La FQ ha sido también estudiada en individuos descendientes de libaneses, indios, árabes, coreanos y chinos (Conneally PM *et al*, 1973).

En España, existen datos sobre la incidencia de la FQ procedentes de los Programas de Detección Precoz regionales de Cataluña, Castilla y León y Baleares:

REGIÓN DE CRIBADO	INCIDENCIA
Cataluña	1/5457
Castilla y León	1/4083
Baleares	1/4433

-DATOS DE INCIDENCIA PROVENIENTES DE PROGRAMAS DE CRIBADO EN ESPAÑA.

I.6.1.1.- TEORÍAS SOBRE LA INCIDENCIA ELEVADA

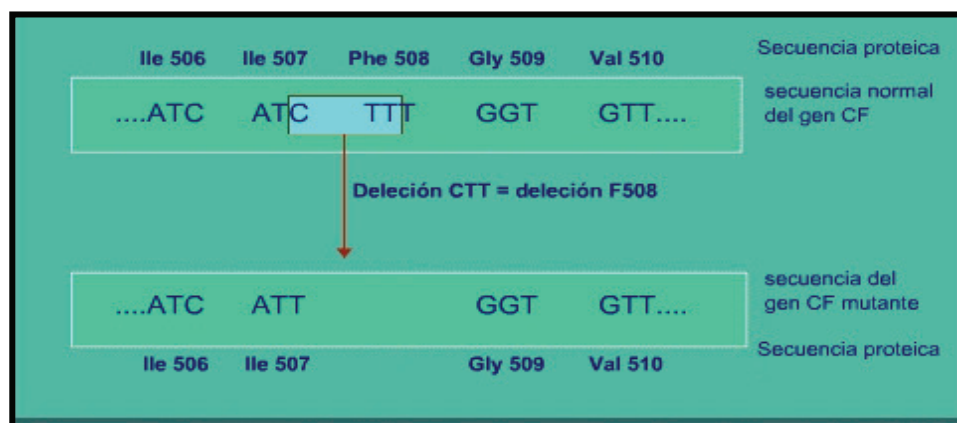
Se han propuesto diversas teorías para tratar de explicar la alta incidencia de la FQ. De entre ellas, la más conocida es la de la ventaja selectiva de los individuos heterocigotos con FQ frente a distintos tipos de diarrea provocados por bacterias como *Vibrio cholerae* (Gabriel SE *et al*, 1994) *E.coli* (Chao AC *et al*, 1994) o *Salmonella Typhi* (Pier GB *et al*, 1998).

Ninguna de las teorías propuestas ha sido demostrada, por lo que todavía se desconoce la causa exacta de la alta incidencia de la FQ. De hecho, la teoría sobre el cólera ha sido rebatida (Cuthbert AW *et al*, 1995) ya que el cólera y la diarrea secretora se producen en todas las poblaciones humanas y por lo tanto no está claro como este mecanismo podría incrementar la frecuencia de los alelos FQ en sólo una raza y no en otras.

I.6.1.2.- CLASIFICACIÓN MUTACIONAL POR FRECUENCIA

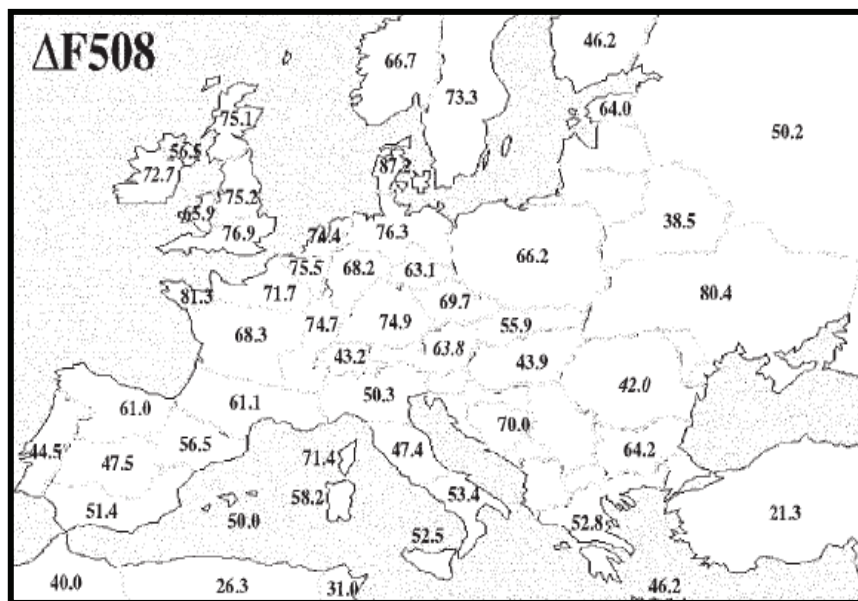
Las mutaciones del gen CFTR que causan fibrosis quística pueden dividirse en tres categorías según su frecuencia: la mutación más común ($\Delta F508$), mutaciones menos frecuentes y mutaciones raras:

1) La mutación $\Delta F508$ fue la primera mutación identificada y se encuentra aproximadamente en el 70% de los alelos FQ en las poblaciones caucásicas (*Cystic Fibrosis Analysis Consortium*, 1990; CFGAC, 1994).



-MUTACIÓN $\Delta F508$.

Esta mutación está aparentemente ausente en nativos africanos y asiáticos, aunque tiene una frecuencia considerable en grupos con mestizaje caucásico como los Afroamericanos (Cutting *Gr et al*, 1992). La frecuencia de la mutación $\Delta F508$ varía entre las poblaciones europeas, con un aparente gradiente de frecuencia creciente desde el sureste hasta el noroeste de Europa (30% en Turquía e Israel, 88% en Dinamarca y partes de las islas Británicas).



-FRECUENCIAS DE LA MUTACIÓN $\Delta F508$ EN EUROPA.

La alta frecuencia de la mutación da lugar a que alrededor de la mitad de todos los pacientes caucásicos con FQ sean homocigotos para la misma. De hecho, en ausencia de esta mutación, la FQ sería una enfermedad hereditaria relativamente rara en Caucásicos y ocurriría aproximadamente en la misma frecuencia en todas las razas (menos de 1 cada 10000).

2) Existe otro grupo de aproximadamente 20 mutaciones *poco frecuentes* que ocurren mundialmente en una frecuencia de 0,1% ó superior. La frecuencia relativa de cada mutación depende de la población, con algunas mutaciones que llegan al 5% de los alelos FQ en algunos grupos (CFGAC, 1994).

3) El resto de las mutaciones (94%) son denominadas como *mutaciones raras*. Sin embargo, cerca de 30 mutaciones tienen una frecuencia apreciable (mayor al 0,1%) en poblaciones específicas como resultado seguramente de un efecto fundador. Un ejemplo sería la mutación Y122X que representa el 48% de los alelos FQ en las Islas Reunión (Francia) pero es extraña en otros lugares (Chevalier-Porst F, 1992).

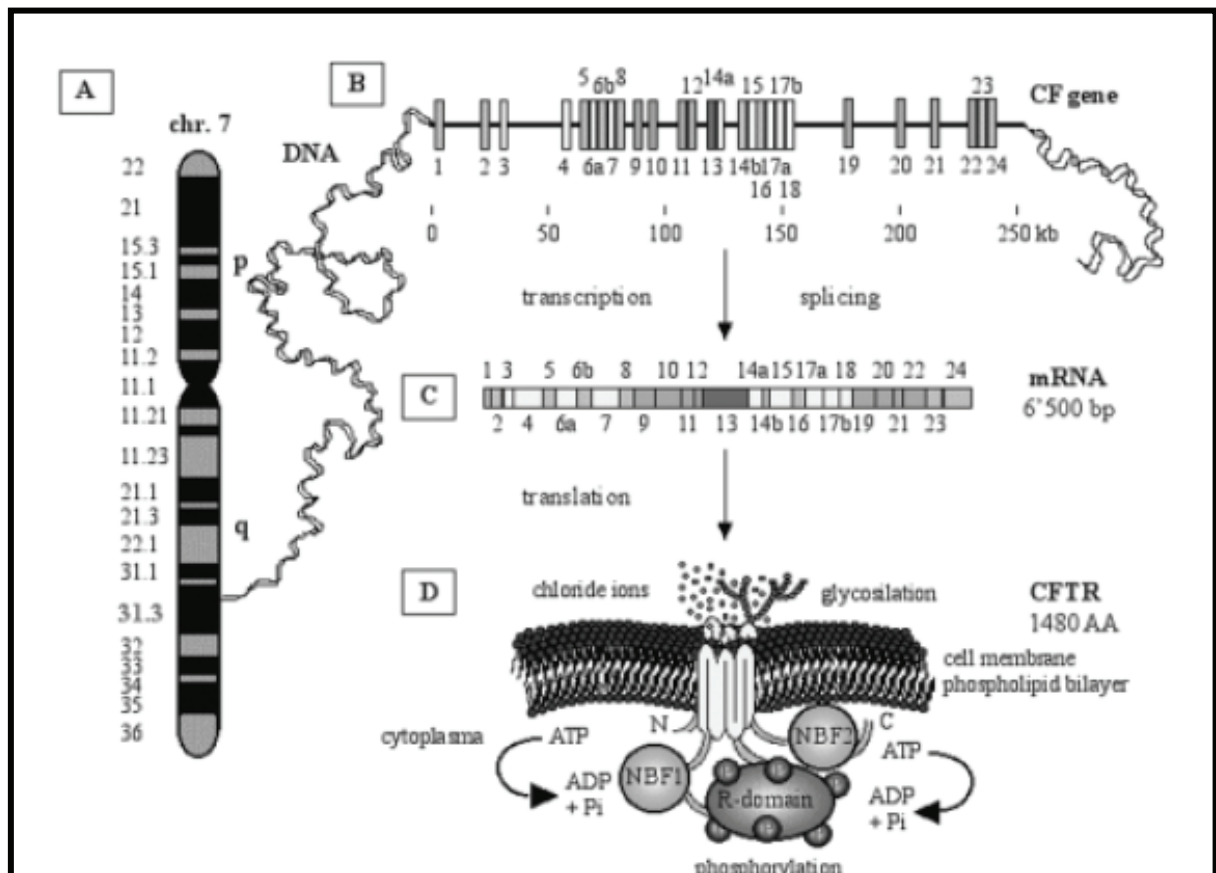
Al menos se han descrito dos casos de FQ debidos a la herencia de dos copias del cromosoma siete de uno de los padres (disomía uniparental) (Spence JE *et al*, 1988; Voss R *et al*, 1989). Esta forma de herencia es extremadamente rara y no debe usarse para corregir las estimaciones del riesgo para portadores sanos de alelos FQ (Warburton D *et al*, 1988).

I.6.2.- AISLAMIENTO Y ESTRUCTURA DEL GEN CFTR

El gen causante de la FQ fue identificado mediante combinación de mapeado físico, aislamiento de regiones exónicas y análisis genético (Kerem B *et al* 1989, Riordan JR *et al* 1989, Rommens JM *et al* 1989). Los fragmentos de ADN aislados de la región entre los marcadores que flanqueaban el locus FQ fueron analizados para secuencias derivadas de los genes. Siguiendo la identificación y posterior eliminación de muchas secuencias candidatas, se aisló un fragmento de ADN de 4300 bp que demostró contener el primer exón del gen responsable de la FQ. A este gen se le denominó el regulador transmembrana de la conductancia de la FQ (**C**ystic **F**ibrosis **T**ransmembrane **C**onductance **R**egulator, **CFTR**) y se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 7 (7q31.2).

El mapeado físico indica que el gen CFTR está compuesto por 27 exones (numerados del 1 al 24) con un tamaño de 250 kb de ADN (Zielinski J *et al* 1991; Ellsworth RE *et al*, 2000). El gen se transcribe a un mRNA maduro de aproximadamente 6500 bp (Riordan JR *et al*, 1989). Se ha descrito el procesamiento alternativo (*splicing*) de muchos exones, pero

ninguno de los transcritos resultantes codifica para una isoforma funcional de CFTR (Cutting GR *et al*, 1994).



-ESTRUCTURA DEL GEN CFTR Y PROCESO DE TRADUCCIÓN.

Muchos estudios han confirmado que el CFTR es el gen responsable de la FQ (Kerem B *et al*, 1989). En primer lugar la delección de tres nucleótidos $\Delta F508$ se encontró únicamente en cromosomas de pacientes con FQ. En segundo lugar, no había recombinaciones entre $\Delta F508$ y el fenotipo de la FQ. Además, la mutación $\Delta F508$ se asoció casi exclusivamente con un haplotipo en fuerte desequilibrio de ligamiento con el locus FQ. Finalmente, cromosomas normales con el haplotipo común a los cromosomas FQ no tienen la $\Delta F508$, indicando que esta delección no era un polimorfismo ligado al haplotipo FQ.

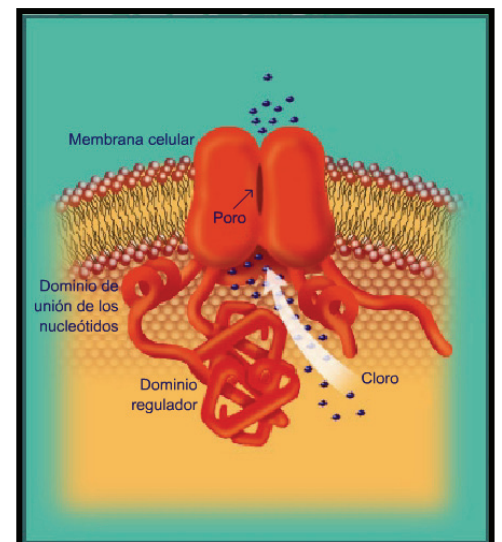
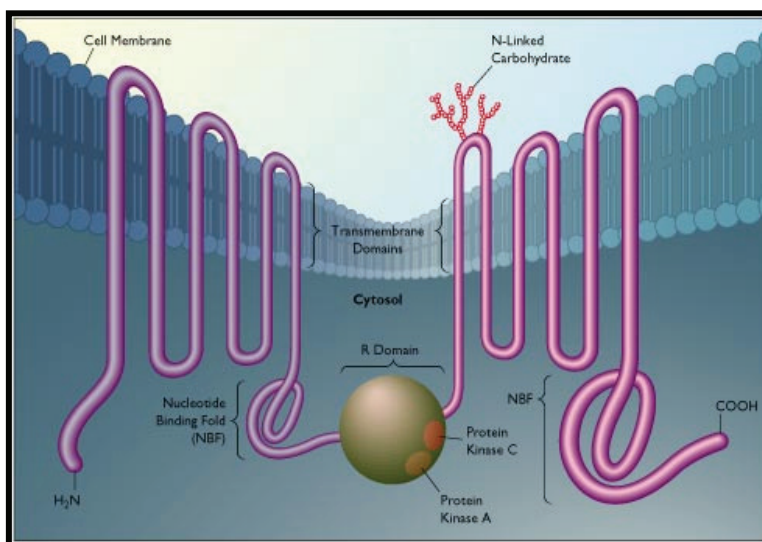
El mRNA de CFTR se expresa en tejidos epiteliales de los pulmones, el páncreas, la glándula sudorípara, el hígado, el intestino delgado y los testículos (Trezise AEO *et al*, 1991; Crawford I *et al*, 1991). Aunque la

expresión del CFTR tiene una regulación temporal y espacial muy precisa, las secuencias de control de la transcripción de CFTR todavía se conocen de manera escasa.

I.6.3.- LA PROTEÍNA CFTR

I.6.3.1.-ESTRUCTURA DE CFTR

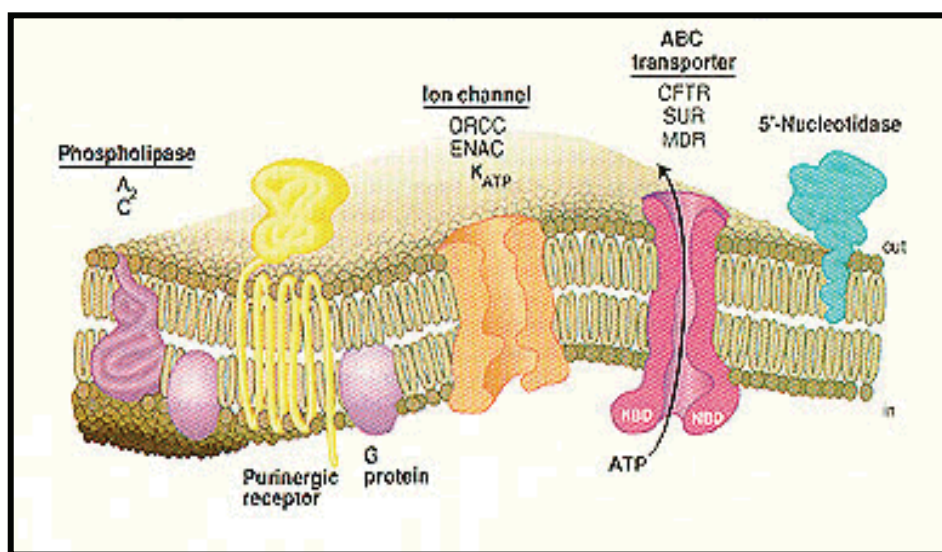
El gen CFTR codifica para una proteína de 1480 aminoácidos que tiene dos estructuras repetidas cada una de las cuales contiene un dominio transmembrana (TMD) compuesto por 6 fragmentos hidrofóbicos unidos a un dominio de unión de nucleótidos (NBD). Estas estructuras están separadas por una región de 241 aminoácidos con muchos residuos cargados y múltiples lugares potenciales para la fosforilación por proteinkinasa A y C (Riordan JR *et al*, 1989). La última región se postuló que estaba involucrada en el control de la función de la proteína y se le denominó dominio R.



-ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA CFTR.

La estructura global del CFTR es muy similar a miembros de la familia MDR (*Multidrug Resistance*). Estas proteínas pertenecen a la superfamilia de

las proteínas ABC (*ATP-binding cassette*), que importan y exportan pequeñas moléculas (fármacos, proteínas, hidratos de carbono e iones) a través de las membranas celulares (Higgins C, 1989; Klein I *et al*, 1999). Los miembros de este grupo de proteínas son muy similares en la región hidrofílica, conteniendo un sitio de unión para el ATP (Hyde SC *et al*, 1990; Riordan JR *et al*, 1989). Mediante comparación con esta familia de proteínas, se propuso que CFTR podría actuar como un transportador dependiente de ATP, posiblemente exportando moléculas a través de las membranas celulares.



-COMPONENTES DEL TRANSPORTADOR ABC.

I.6.3.2.- FUNCIONES DE CFTR

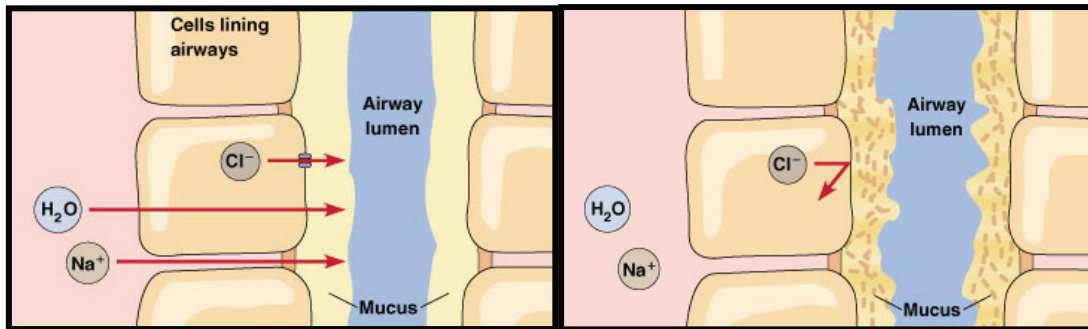
Aunque la estructura global de CFTR es semejante a los transportadores ABC, la evidencia experimental demuestra que su función principal es la de actuar como canal de cloro. De diversos estudios se obtiene que la expresión de CFTR da lugar a la aparición de nuevas secreciones de cloro estimuladas por el AMPc en una variedad de células derivadas de tejidos no epiteliales que no tenían canales de cloro AMPc dependientes (Kartner N *et al*, 1991; Anderson MP *et al*, 1991A). Además, la magnitud de esta secreción se correlacionó de un modo lineal con la cantidad de proteína CFTR presente.

También se ha demostrado que CFTR es capaz de regular el funcionamiento de otros canales como ROMK, ENaC, ORCC, NHE3 y TRPV4 (Bush A *et al*, 2006).

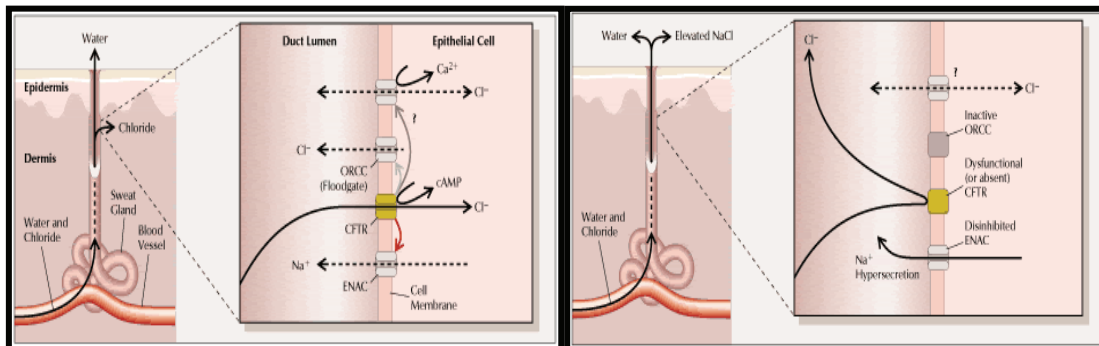
Se han propuesto otras muchas funciones para CFTR además de las anteriormente citadas. Se ha sugerido, por ejemplo, que CFTR modula la secreción de bicarbonato mediante la regulación del intercambiador de bicarbonato y cloro (Poulsen JH *et al*, 1994; Mastricola T *et al*, 1998; Lee MG *et al*, 1999). CFTR puede también jugar un papel en la regulación de canales aniónicos regulados por volumen y canales de uniones *gap*. Otras funciones propuestas incluyen la de sensor de los niveles intracelulares de ATP, conducción de una gran variedad de pequeños solutos y agua a través de las membranas celulares y la de facilitar la acidificación de las organelas intracelulares. La pérdida de estas propiedades podría explicar un gran número de desajustes metabólicos en las células. Sin embargo, la evidencia es insuficiente para corroborar estas funciones de CFTR.

I.6.3.3.- CFTR EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA

El transporte anormal de sodio y cloro en las células epiteliales de las vías aéreas que recubren los pulmones y las glándulas sudoríparas es el defecto bioquímico en los pacientes con FQ (Knowles MR *et al*, 1983; Quinton PM, 1983). Un gran número de estudios ha demostrado que la transfección de células epiteliales derivadas de pacientes con FQ con el ADNc salvaje da lugar a una reversión al fenotipo normal. Asimismo su expresión produce una corrección del defecto en el transporte de iones (Rich DP *et al*, 1990). Además, la reducción en los niveles endógenos de CFTR se asocia a una pérdida del transporte de cloro activado por AMPc en las células epiteliales. Varios estudios han confirmado que CFTR juega un papel central en el transporte de cloro y sodio que es defectuoso en pacientes con FQ (Sorscher EJ *et al*, 1991; Trapnell BC *et al* 1991; Wagner JA *et al*, 1991).



-PULMONES EN INDIVIDUO SANO (IZQUIERDA) Y EN INDIVIDUO CON FQ (DERECHA).



-GLÁNDULA SUDORÍPARA EN INDIVIDUO SANO (IZQUIERDA) Y EN INDIVIDUO CON FQ (DERECHA).

Aunque se tienen bastantes conocimientos a nivel molecular y celular, el mecanismo por el cual la disfunción de CFTR lleva a una manifestación de la enfermedad a nivel orgánico no se comprende todavía con exactitud. Esto es particularmente cierto en el caso de la enfermedad pulmonar, la primera causa de morbilidad y mortalidad en FQ. De hecho, un debate importante en la investigación se centra en si la fisiopatología subyacente en FQ se debe a una pérdida de la absorción o secreción de electrolitos y fluidos o a una combinación de ambas (Wine JJ *et al*, 1999).

I.6.4.- MUTACIONES EN EL GEN CFTR

Para coordinar la recogida y distribución de información relativa a las mutaciones en FQ se creó en 1989 un consorcio mundial con 90 laboratorios, el *Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium*, con una página web en la que se puede contrastar información actualizada sobre las diversas mutaciones en individuos con FQ (www.genet.sickkids.on.ca/cftr/).

El objetivo de esta base de datos es el de proporcionar a los investigadores en FQ y otros profesionales relacionados información actualizada sobre las mutaciones individuales en el gen CFTR.

De esta manera se intenta incrementar y facilitar la comunicación entre investigadores de FQ que estén trabajando en la identificación de mutaciones en el gen CFTR evitando esfuerzos innecesarios e intentando mejorar la comprensión de la función de los productos génicos en los pacientes con FQ así como la correlación de los síntomas clínicos y las mutaciones. Actualmente existen 130 grupos que trabajan en este consorcio en alrededor de 30 países.

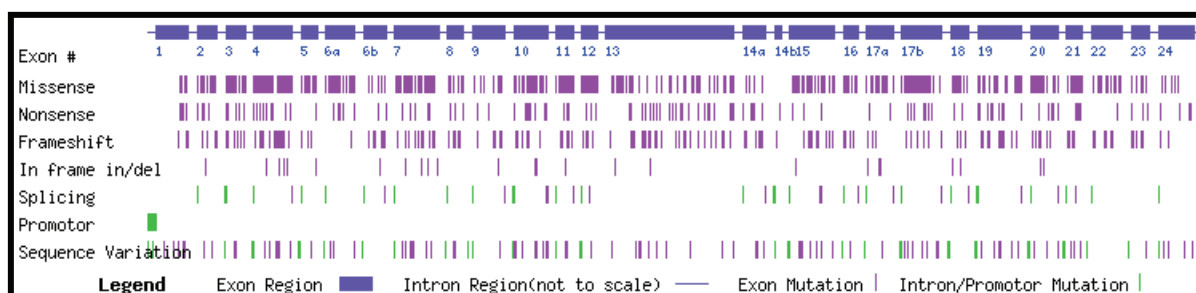
Además de en esta base de datos, se puede encontrar información extensa y actualizada sobre las mutaciones del gen CFTR en bases de datos como la *Human Genome Mutation Database* (www.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=CFTR).

Actualmente se encuentran clasificadas más de 1400 mutaciones en el gen CFTR, la mayoría de las cuales corresponden a sustituciones nucleotídicas que dan lugar a un cambio de aminoácido o codón de parada. En segundo lugar están las pequeñas deleciones y posteriormente las sustituciones nucleotídicas que afectan al procesamiento del mRNA.

En la tabla siguiente se pueden observar las distintas mutaciones descritas actualmente clasificadas según su naturaleza:

Mutation type	Total number of mutations
Missense/nonsense	836
Splicing	189
Regulatory	7
Small deletions	199
Small insertions	75
Small indels	25
Gross deletions	55
Gross insertions	6
Complex rearrangements	20
Repeat variations	5
TOTAL	1417

-CLASIFICACIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN CFTR (HGMD-FEBRERO 2008).



-DISTRIBUCIÓN POR EXÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN CFTR.

La mayoría de las mutaciones en el gen CFTR se corresponden con cambios que afectan a uno o pocos nucleótidos aunque en los últimos años se han detectado grandes deleciones que dan lugar a la pérdida de fragmentos grandes del gen (Hantash FM *et al*, 2006; Schneider M *et al*, 2007).

Las distintas mutaciones se denominan siguiendo un criterio de recomendaciones establecido en el año 1998 (Antonarakis SE, 1998), clasificándose en los siguientes tipos:

- cambio de aminoácido (*missense*): el cambio de nucleótido da lugar a la sustitución de un aminoácido. La mayoría de las mutaciones pertenecen a este tipo.

- cambio de pauta de lectura (*frameshift*): la inserción o delección de un nucleótido da lugar a una alteración en la pauta de lectura.
- modificaciones en el corte y empalme del gen *CFTR* (*splicing*): se ha detectado *splicing* alternativo implicando la pérdida de los exones 9 y 12 (Chu CS *et al*, 1993) (Slomski R *et al*, 1992).
- mutaciones sin sentido (*nonsense*): la mutación da lugar a un codón de terminación.
- inserción o delección de varios aminoácidos o parte del gen *CFTR*.

Debido a la frecuencia y distribución de las mutaciones $\Delta F508$, G542X y N1303K se cree que estas tres mutaciones fueron las primeras en originarse y expandirse (De Semir D, 2005). Haplotipos con tres microsatélites intragénicos (IVS8CA, IVS17bTA y IVS17bCA) datan el origen de las mutaciones en unos 35000 años (Morral N *et al*, 1993). Morral y colaboradores han datado la mutación $\Delta F508$ en 52000 años (Morral N *et al*, 1994).

I.6.5.- CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES

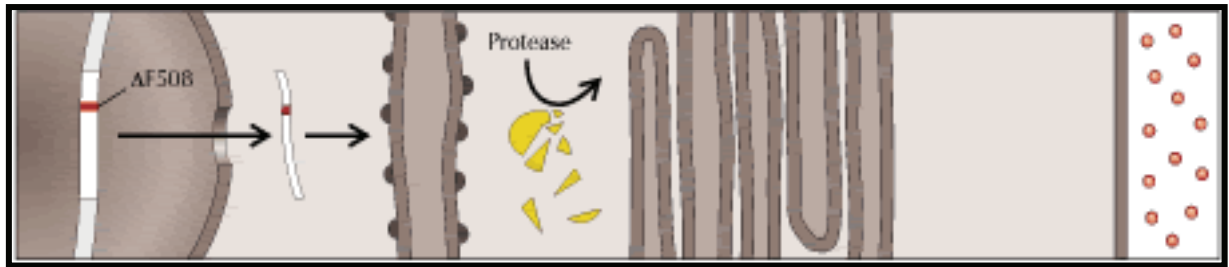
Las mutaciones en CFTR tienen una gran variedad de efectos en la función del canal (Welsh MJ *et al*, 1993). El conocimiento de las consecuencias de las mutaciones permite un punto de partida para la comprensión de la complicada vía desde el defecto del gen a la patología en el organismo y abre importantes caminos para nuevas aproximaciones terapéuticas a la FQ. Sólo se conocen las consecuencias de una pequeña fracción de las mutaciones en CFTR. En la mayoría de los casos, el efecto de la mutación causante de enfermedad ha sido inferido de estudios de CFTR mutantes sobreexpresados en células heterocigóticas. Pocos estudios han analizado las mutaciones de CFTR en células primarias o tejido nativo. Por lo tanto nuestra comprensión de las consecuencias de las mutaciones en CFTR está todavía en sus fases iniciales. Sin embargo, existe un cuadro bastante claro sobre los efectos de la mutación $\Delta F508$ y una serie de mutaciones poco frecuentes.

Se han descrito 5 clases de mutaciones que explican los distintos mecanismos moleculares que producen la disfunción del canal CFTR (Welsh MJ y Smith AE, 1993) y se clasifican como se detalla a continuación:

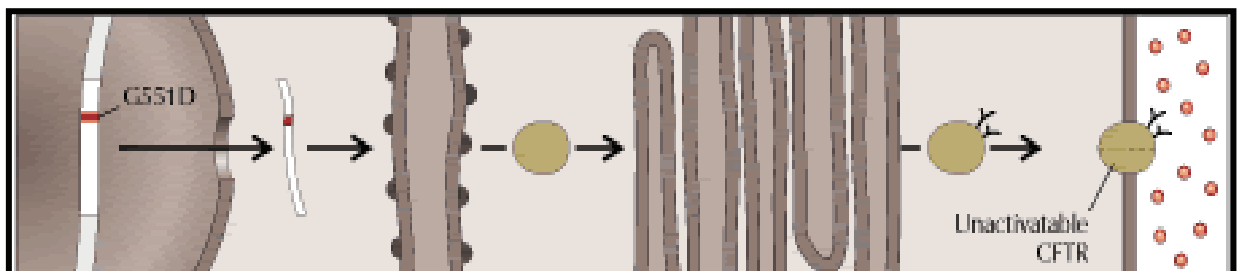
- **Clase I:** incluye mutaciones que provocan la ausencia de síntesis de la proteína debido a mutaciones *nonsense*, *frameshift* o de *splicing*. La mayoría de las mutaciones en el gen CFTR son de esta clase.



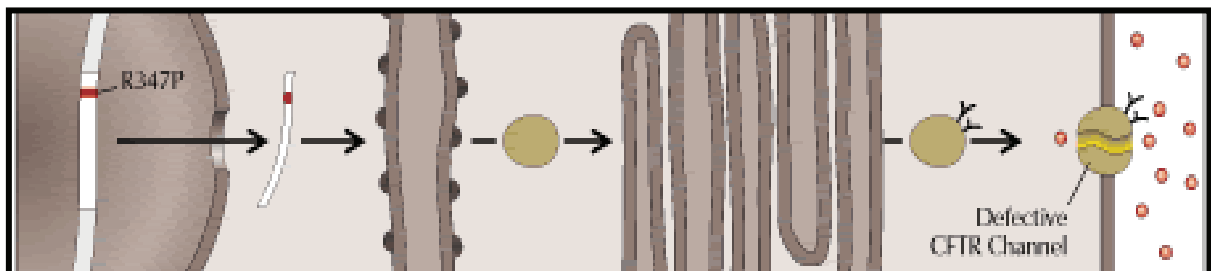
- **Clase II:** estas mutaciones impiden que la proteína llegue a la membrana celular provocando una maduración defectuosa de la misma. Este es el caso de la mutación $\Delta F508$ que da lugar a la retención de la proteína CFTR en el retículo endoplásmico.



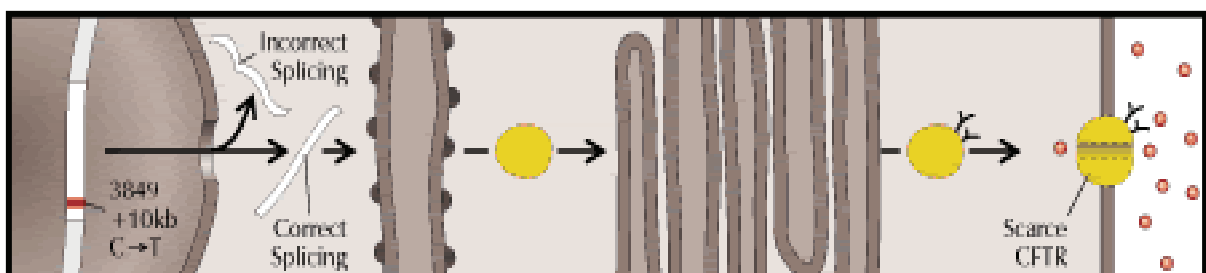
- **Clase III:** estas mutaciones alteran la regulación del canal CFTR. Es el caso de las mutaciones *missense* que afectan a la unión a ATP.



- **Clase IV:** estas mutaciones dan lugar a una conducción anómala del flujo de iones cloruro. Estas mutaciones son del tipo *missense* y se localizan en los dominios transmembrana.



- **Clase V:** incluye mutaciones que producen una disminución de la síntesis de la proteína CFTR.



Mientras que las mutaciones de clase I y II se asocian a FQ con insuficiencia pancreática, las mutaciones de clase III, IV y V están asociadas a una mayor variabilidad en las manifestaciones clínicas.

Con posterioridad a esta clasificación se propuso una clase adicional de mutaciones en CFTR (**Clase VI**) que afectaría a la estabilidad de la proteína (Haardt M *et al*, 1999).

En la siguiente tabla (McKone EF *et al*, 2003) se pueden ver ejemplos de mutaciones agrupadas según su clase funcional:

CLASE FUNCIONAL DE LA MUTACIÓN	MUTACIONES
CLASE I	G542X, R553X, W1282X, R1162X, 621-1G-T, 1078delT, 3659delC, 1717-1G-A .
CLASE II	Δ F508, Δ I507, N1303K, S549N, G85E.
CLASE III	G551D, R560T.
CLASE IV	R117H, R334W, R347P.
CLASE V	3849+10KbC-T, 2789+5G-A, A455E.

I.6.6.- CORRELACIONES GENOTIPO-FENOTIPO

El estudio molecular de las mutaciones en un paciente junto con la evaluación de las manifestaciones clínicas que presenta permiten establecer la correlación entre el genotipo y el fenotipo. La mayor dificultad para desarrollar estos estudios de correlación radica en reunir un número suficiente de pacientes con una mutación en común y evaluarlos bajo los

mismos criterios clínicos que permitan definir el fenotipo asociado a dicha mutación.

El fenotipo de la FQ se caracteriza, como se ha visto anteriormente, por su complejidad y las repercusiones multiorgánicas. Además, la variabilidad de las manifestaciones clínicas depende del órgano que se encuentre afectado siendo baja para las glándulas sudoríparas y el aparato reproductor masculino, alta para la función pancreática y muy alta para el sistema respiratorio (Welsh MJ *et al*, 1995; Zielinsky J *et al*, 1995; Kerem E *et al*, 1996). Para valorar la contribución del genotipo de CFTR a las diferentes manifestaciones clínicas en estos órganos se han llevado a cabo diversos estudios genotipo-fenotipo.

TRACTO GASTROINTESTINAL

De las múltiples manifestaciones gastrointestinales en la FQ, la función pancreática exocrina es la más frecuente y profundamente afectada (el 85% de pacientes con FQ sufren IP). En el resto de pacientes el páncreas exocrino es anormal pero funcionalmente adecuado y los pacientes no necesitan suplementación enzimática con las comidas (suficiencia pancreática). El análisis de mutaciones determinadas en CFTR en pacientes con estos fenotipos (IP vs SP) ha revelado dos categorías de alelos: severos y leves (*mild*) (Kristidis P *et al*, 1992).

Un alelo severo confiere insuficiencia pancreática solamente si va emparejado a otro alelo severo, mientras que un alelo leve mantiene la función pancreática de manera dominante, incluso con una segunda mutación severa. Todos los alelos leves conocidos pertenecen a las clases IV y V mientras que los severos se corresponden con las clases I, II, III y VI. Se puede decir que hay una buena relación entre los alelos CFTR (severos o leves) y la función pancreática exocrina, ofreciendo la oportunidad de una intervención temprana en pacientes en los que se detectan de manera precoz dos mutaciones severas.

SISTEMA RESPIRATORIO

Aunque muchos órganos y sistemas están afectados en la FQ, ninguno ha recibido tanta atención como el sistema respiratorio. Existen varias razones para ello, principalmente que la enfermedad pulmonar es la primera causa de morbilidad y mortalidad en la FQ y además que probablemente es el aspecto fenotípico más complejo y difícil de entender.

Desafortunadamente, los múltiples estudios que se han hecho sobre la relación entre el genotipo en CFTR y el estatus pulmonar ofrecen resultados discrepantes, probablemente debido a las diferencias en el diseño experimental y la selección de parámetros clínicos a evaluar. Existe incluso una variación considerable en la severidad de la enfermedad pulmonar en pacientes con el mismo genotipo.

El consenso actual es que, con la excepción de unas pocas mutaciones, la severidad de la enfermedad pulmonar en pacientes con FQ no puede ser predicha de una manera fiable en función del genotipo. Sin embargo, los resultados de estudios poblacionales sobre la respuesta pulmonar muestran una progresión menos severa de la enfermedad pulmonar en pacientes con mutaciones leves.

GLÁNDULAS SUDORÍPARAS

El impacto de los genotipos de CFTR ha sido investigado en otros órganos afectados por la FQ. Uno de ellos, las glándulas sudoríparas, fue examinado mediante la medida de la concentración de cloruro en sudor en pacientes con mutaciones diferentes en CFTR. Los estudios han demostrado que ciertas mutaciones leves tienden a estar asociadas con menores niveles de cloruro mientras que la mayoría de los genotipos severos dan lugar a una mayor concentración de cloruro.

I.6.7.- GENES MODIFICADORES

La variedad de manifestaciones pulmonares en los pacientes con FQ y el desarrollo de complicaciones relacionadas con la FQ no se correlacionan en ocasiones con el genotipo de CFTR ni con los factores ambientales. Estudios recientes sugieren que las variaciones fenotípicas en la FQ pueden ser atribuidas a variaciones genéticas en otros genes diferentes al CFTR denominados genes modificadores. En los últimos años muchos genes modificadores candidatos se han investigado en relación con la FQ, especialmente genes implicados en el control de la infección, la inmunidad y la inflamación. Algunos de estos genes se han identificado de alguna manera como modificadores del fenotipo en la FQ, mientras que otras asociaciones no se han confirmado todavía (Slieker MG *et al*, 2005).

RELACIONADOS CON ENFERMEDAD PULMONAR	
GEN	REFERENCIAS
MBL (<i>Mannose-binding lectin</i>)	Garred P <i>et al</i> 1999, Davies JC <i>et al</i> 2004, Gabolde M <i>et al</i> 1999, Yarden J <i>et al</i> 2004.
NOS1 (<i>Nitric oxide synthase- 1</i>)	Grasemann H <i>et al</i> 2000, Grasemann H <i>et al</i> 2002, Texerau J <i>et al</i> 2004.
NOS3 (<i>Nitric oxide synthase- 3</i>)	Grasemann H <i>et al</i> 2003.
AAT (<i>α1-antitrypsin</i>)	Doring G <i>et al</i> 1994, Meyer P <i>et al</i> 2002, Mahadeva R <i>et al</i> 1998, Mahadeva R <i>et al</i> 1998b, Frangolias DD <i>et al</i> 2003, Henry MT <i>et al</i> 2001.
HLA-II (<i>Human leukocyte antigen gene II</i>)	Aron Y <i>et al</i> 1999.
TNF-α (<i>Tumor necrosis factor-α</i>)	Hull J y Thomson AH 1998.

GST M1 <i>(Gluthation- S-transferase M1)</i>	Hull J y Thomson AH 1998.
GST M3 <i>(Gluthation- S-transferase M3)</i>	Flamant C <i>et al</i> 2004.
TGF β1 <i>(Transforming growth factor-β1)</i>	Arkwright PD <i>et al</i> 2000.
ACE <i>(Angiotensin 1 converting enzyme)</i>	Arkwright PD <i>et al</i> 2003.
β2AR <i>(β2 adrenoreceptor)</i>	Buscher R <i>et al</i> 2002.
CLC-2 <i>(Chloride channel-2)</i>	Blaisdell CJ <i>et al</i> 2004.
RELACIONADOS CON ENFERMEDAD GASTROINTESTINAL	
MBL <i>(Mannose-binding lectin)</i>	Gabolde M <i>et al</i> 2001.
AAT <i>(α1-antitrypsin)</i>	Mahadeva R <i>et al</i> 1998.
HLA-II <i>(Human leukocyte antigen gene II)</i>	Carrington M <i>et al</i> 1994, Lanng S <i>et al</i> 1993, Duthie A <i>et al</i> 1995.
TNF-α <i>(Tumor necrosis factor-α)</i>	Hull J y Thompson AH 1998.
GST M1 <i>(Gluthation- S-transferase M1)</i>	Hull J y Thompson AH 1998.
GST M3 <i>(Gluthation- S-transferase M3)</i>	Flamant C <i>et al</i> 2004.
GST P1 <i>(Gluthation- S-transferase P1)</i>	Henrion-Caude A <i>et al</i> 2002.
ACE <i>(Angiotensin 1 converting enzyme)</i>	Arkwright PD <i>et al</i> 2003.

HFE (Putative hereditary hemochromatosis gene)	Rohlfes EM <i>et al</i> 1998, Devaney J <i>et al</i> 2003.
ATB⁰ (Neutral amino acid transporter B0)	Larriba S <i>et al</i> 2001.

-POSIBLES GENES MODIFICADORES INVESTIGADOS EN FIBROSIS QUÍSTICA.

Los genes modificadores pueden influir en la severidad de los fenotipos de FQ mediante un gran número de mecanismos. Pueden modular el fenotipo actuando en el nivel molecular básico, como permitiendo una conductividad alternativa de cloruros, o regulando el procesado y la expresión del gen CFTR. Pueden también actuar modulando la susceptibilidad a la infección y a la respuesta inflamatoria. Además, el fenotipo pulmonar en la FQ puede ser modificado por genes asociados al aclaramiento mucociliar o a la reparación del tejido epitelial dañado. Finalmente, los problemas gastrointestinales (hígado, páncreas, intestino) en la FQ pueden estar influenciados por genes que modulan la proteólisis y la fibrosis.

I.6.8.-INFORMACIÓN Y ASOCIACIONES

Es destacable la existencia de numerosas páginas web en las que se ofrece información acerca de la FQ, tanto para clínicos como para familiares de personas afectadas con dicha patología. Estos son algunos de los sitios web de mayor utilidad con información sobre FQ:

ASOCIACIONES

- Federación Española contra la FQ: www.fibrosis.org
- Sociedad Europea de FQ: www.ecfsoc.org
- Fundación Sira Carrasco para ayuda a la FQ:
www.fundacionfibrosisquistica.org
- Federación latinoamericana de FQ:
www.fibrosis.org/paises/hispano/flafq.htm
- Asociación estadounidense de FQ: www.cfroundtable.com
- www.cysticfibrosis.com
- www.cff.org/home
- www.mycysticfibrosis.com
- www.cfawareness.org
- www.cfww.org

BASES DE DATOS

- Human Genome Mutation Database (HGMD):
www.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=CFTR
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM):
www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=602421
- Cystic Fibrosis Mutation Database: www.genet.sickkids.on.ca/cftr
- SNPper: <http://snpper.chip.org>

VARIAS

- Tutorial sobre FQ en español:
www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/tutorials/cysticfibrosisspanish.html
- Investigación en FQ: www.cfri.org/home.htm
- Libro Blanco de atención a la fibrosis quística:
www.famma.org/asociaciones/Libro%20Blanco%20FibrosQuistica.pdf

Fecha de acceso a direcciones web: mayo 2008.



OBJETIVOS

II.1.- OBJETIVOS

- 1.- Desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico molecular para el análisis genético en fibrosis quística.
- 2.- Adecuación de las tecnologías desarrolladas para su aplicación en programas de cribado neonatal y aprovechamiento de las mismas para optimizar, simplificar y abaratar dichos programas.
- 3.- Estudio de la incidencia de la enfermedad en nuestra comunidad y creación de un mapa poblacional con las mutaciones más frecuentes en individuos afectados con fibrosis quística en Galicia.



MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.- SECUENCIACIÓN DIRECTA DEL GEN CFTR

III.1.1.- METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE SECUENCIAS

III.1.1.1.- EXTRACCIÓN DEL ADN SANGUÍNEO

Las muestras sanguíneas (sangre total periférica) fueron recogidas de los pacientes en tubos EDTA (tapón malva) y posteriormente el ADN fue extraído mediante el kit de Promega WIZARD® GENOMIC DNA PURIFICATION KIT. Para ello en nuestro caso se utilizó un volumen de muestra de 300 µL según el siguiente protocolo:

a) Lisis de los glóbulos rojos

A los 300 µL de muestra se añaden 900 µL de *Cell Lysis Solution* mezclando por inversión a temperatura ambiente durante 10 minutos aproximadamente y golpeando frecuentemente con los dedos para facilitar el desprendimiento de las células.

Posteriormente se centrifuga a 12000 rpm durante 2 minutos, se retira el sobrenadante dejando el *pellet* (y un pequeño volumen residual aproximado de 50 µL) que se vortea.

b) Lisis del núcleo y precipitación de las proteínas

Se añaden ahora 300 µL de *Nuclei Lysis Solution* mezclando por inversión y se resuspende ayudándose de una pipeta.

Posteriormente se añaden 100 µL de *Protein Precipitation Solution* y se vortea. Se centrifuga a 12000 rpm durante 3 minutos.

c) Precipitación del ADN y rehidratación

Se pasa el sobrenadante a un nuevo tubo y se añaden 300 μ L de isopropanol mezclando por inversión hasta que se hace visible el ovillo de ADN.

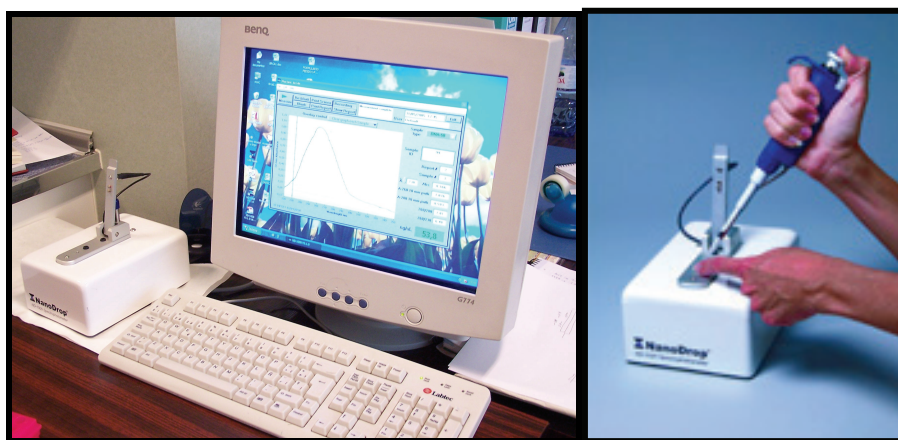
Se centrifuga 4 minutos a 12000 rpm y se retira posteriormente el isopropanol.

Finalmente se añaden 300 μ L de etanol al 70% y se centrifuga nuevamente 4 minutos a 12000 rpm. Se retira el etanol y se deja secar el *pellet* al aire con el tubo abierto entre 10 y 15 minutos.

Por último se añaden 100 μ L de *DNA Rehydration Solution* y se deja una hora en un baño con agitación a 65°C resuspendiendo cada 10 minutos el ADN manualmente.

III.1.1.2.- CUANTIFICACIÓN DEL ADN TOTAL

Tras haber procedido a la extracción del ADN de las muestras, se pasó a su cuantificación, para la cual se utilizó el espectrofotómetro NANODROP ND-1000. Para ello se usó una cantidad de muestra de 2 μ L.

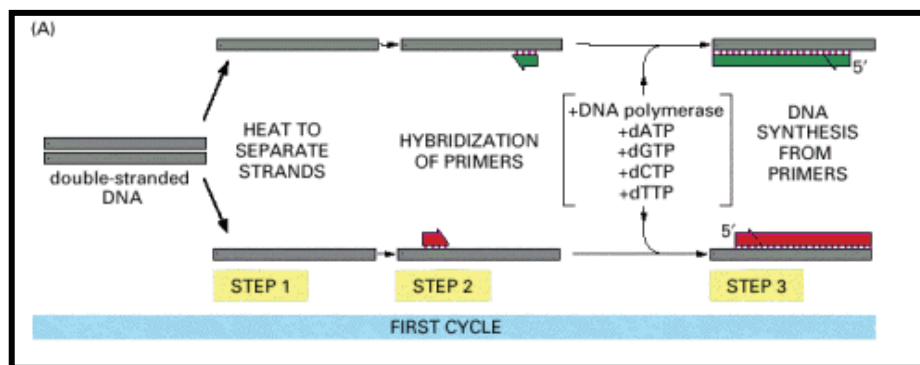


-CUANTIFICACIÓN EN ESPECTROFOTÓMETRO NANODROP.

III.1.1.3.- AMPLIFICACIÓN DEL ADN

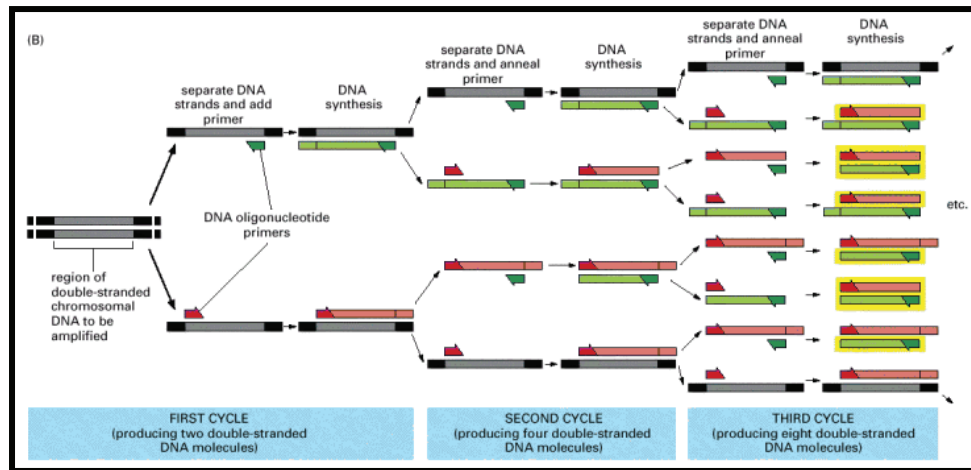
El primer paso a la hora de secuenciar el gen consistió en buscar toda la información existente acerca de la secuencia del mismo hasta asegurarse de haber obtenido la secuencia correcta. Existen distintas bases de datos *online* que pueden proporcionarnos información al respecto como la de *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html) o la de *Ensembl* (www.ensembl.org/index.html). En concreto, la que se utilizó más asiduamente fue la del *SNPper* del *Children's Hospital Informatics Program* (<http://snpper.chip.org>) debido a los formatos en los que presentan los datos, muy intuitivos y de fácil manejo.

La amplificación del ADN se llevó a cabo mediante PCR. La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es un método básico de amplificación de material genético en los laboratorios de biología molecular. Consiste en la utilización de dos oligonucleótidos sintéticos (*primers* o cebadores) complementarios a los fragmentos de ADN a amplificar.



-ESQUEMA DEL PROCESO DE AMPLIFICACIÓN GENÉTICA POR PCR.

En cada ciclo de PCR se comienza con un breve calentamiento para separar las dos cadenas. Posteriormente se disminuye la temperatura para que se produzca la hibridación (unión) de los *primers* y finalmente se vuelve a aumentar para que actúe la ADN polimerasa y se sintetice la nueva cadena de ADN. De esta manera se consigue amplificar la cantidad de ADN de manera exponencial.



-AUMENTO EXPONENCIAL EN LA CANTIDAD DE ADN EN LA PCR.

En nuestro caso para la PCR se utilizó generalmente la MASTERMIX 2,5 de Eppendorf que consiste en una mezcla de Taq-ADN polimerasa (0,06U/ μ L), *Buffer* 2,5X, dNTPs 500 μ M y estabilizadores. Con ello se logra simplificar los pasos de la PCR reduciendo así el número de pipeteos y la posibilidad de contaminación.

A continuación se muestra una tabla con las secuencias de los *primers* utilizados para la amplificación de los diferentes exones del gen CFTR:

EXÓN	PRIMER	SECUENCIA 5'-3'	AMPLICIÓN
1	1iF	TCGGCTTTTAACCTGGGCAGTGA	354 bp
	1iR	GTGGGCACGTGTCTTTCCGAAGC	
2	2i5	CCAAATCTGTATGGAGACCA	378 bp
	2i3	TATGTTGCCCAGGCTGGTAT	
3	3i5	CTTGGGTTAATCTCCTTGGA	308 bp
	3i3	ATTCACCAGATTTCTAGTC	
4	4i5	TCACATATGGTATGACCCTC	438 bp
	4i3	TTGTACCAGCTCACTACCTA	
5	5i5	ATTTCTGCCTAGATGCTGGG	394 bp
	5i3	AACTCCGCCTTTCCAGTTGT	

6A	6ai5	TTAGTGTGCTCAGAACCACG	393 bp
	6ai3	CTATGCATAGAGCAGTCCTG	
6B	6bi5	TGGAATGAGTCTGTACAGCG	417 bp
	6bi3	GAGGTGGAAGTCTACCATGA	
7	7i5	AGACCATGCTCAGATCTTCCAT	410 bp
	7i3	GCAAAGTTCATTAGAAGTATC	
8	8i5	ATGAATCCTAGTGCTTGGCA	402 bp
	8i3	CTCCTTCCAGTTCTACCAG	
9	9i5	TAATGGATCATGGGCCATGT	543 bp
	9i3	ACAGTGTTGAATGTGGTGCA	
10	10i5	GCAGAGTACCTGAAACAGGA	489 bp
	10i3	CATTCACAGTAGCTTACCCA	
11	11F	TGTGCCTTTCAAATTCAGATTG	376 bp
	11i3	GCACAGATTCTGAGTAACCATAAT	
12	12i5	GTGAATCGATGTGGTGACCA	426 bp
	12i3	CTGGTTTAGCATGAGGCGGT	
13a	13i5	TGCTAAAATACGAGACATATTGCA	333 bp
	mR13e3	AGGAGCATCTCCTTCTAATGAGA	
13b	13e5b	TGATTCTTTGACCAATTTAGTG	661 bp
	13i3A	TACACCTTATCCTAATCCTATGAT	
14A	14ai5	AAAAGGTATGCCACTGTTAAG	510 bp
	14ai3	GTATACATCCCCAACTATCT	
14B	14BS	GCATGGGAGGAATAGGTGAA	186 bp
	14BAS	TGCTTGGGAGAAATGAAACA	
15	15i5	GTGCATGCTCTTCTAATGCA	484 bp
	15i3	AAGGCACATGCCTCTGTGCA	
16	16i5	CAGAGAAATTGGTCGTTACT	285 bp
	16i3	ATCTAAATGTGGGATTGCCT	
17A	17AF	GACACACTTTGTCCACTTTGC	492 bp
	17ai3	TGTACACCAACTGTGGTAAG	

17B	17bi5	TTCAAAGAATGGCACCAGTGT	461 bp
	17bi3	ATAACCTATAGAATGCAGCA	
18	18i5	GTAGATGCTGTGATGAACTG	399 bp
	18i3	AGTGGCTATCTATGAGAAGG	
19	19i5	GCCCGACAAATAACCAAGTGA	555 bp
	19i3	GCTAACACATTGCTTCAGGCT	
20	20i5	GGTCAGGATTGAAAGTGTGCA	472 bp
	20i3	CTATGAGAAAAGTGCAGTGA	
21	21i5	AATGTTTACAAGGACTCCA	475 bp
	21i3	CAAAGTACCTGTTGCTCCA	
22	22F	GGTATCTGAACTATCTTCTCTA	251 bp
	22i3	TGTCACCATGAAGCAGGCAT	
23	23F	CCCATGGTTGAAAAGCTGAT	414 bp
	23i3	TAAAGCTGGATGGCTGTATG	
24	24i5	GGACACAGCAGTTAAATGTG	548 bp
	24i3	ACTATTGCCAGGAAGCCATT	

Las secuencias de los *primers* necesarios para la amplificación-secuenciación se obtuvieron de la *Clinical Molecular Genetics Society*, que en su página web (www.cmgs.org/BPG/Guidelines/1st_ed/cf.htm. Fecha de acceso: septiembre 2003) ofrecía un apéndice en el que se proponían los *primers* necesarios para amplificar mediante PCR los distintos fragmentos del gen CFTR. Los *primers* fueron suministrados por la casa Sigma-Genosys.

Sin embargo, tras pruebas iniciales, se comprobó que no todos los fragmentos del gen se amplificaban o secuenciaban de forma adecuada por lo cual en algunos casos los *primers* propuestos se tuvieron que cambiar (así sucedió con los primers 8i5, 8i3, 11F, 14BS, 14BAS, 17AF, 22F y 23F). Para el diseño de éstos se utilizó el programa *Primer3*, de acceso gratuito *online* en la siguiente dirección:

http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

Las cantidades de reactivos utilizadas para llevar a cabo la PCR fueron:

- Agua MILLI-Q: 5 μ L
- Eppendorf mastermix: 5 μ L
- ADN: 1 μ L
- *Primer forward*: 0,75 μ L
- *Primer reverse*: 0,75 μ L

Las concentraciones de trabajo de los *primers* fueron 10 μ M (dilución 1/10 del *stock* 100 μ M). Para la amplificación se utilizaron 15 picomoles y para la reacción de secuencia, como se verá más adelante, 10 picomoles. El agua MILLI-Q se obtuvo del dispositivo GRADIENT A10 de Millipore.

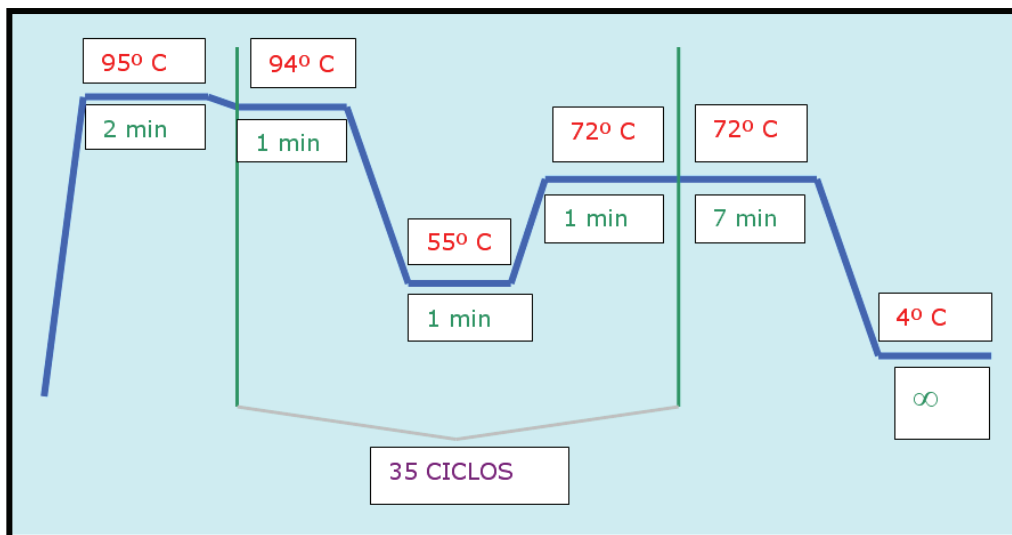
Además, antes de introducir la placa en el termociclador se añadieron unas gotas de aceite mineral a cada pocillo (*Mineral oil for molecular biology Sigma®*) con la finalidad de tratar de evitar cualquier tipo de evaporación de los reactivos.

Los termocicladores que se utilizaron tanto en la amplificación como en el resto de pasos hasta la consecución de la secuencia de ADN fueron de dos tipos, ambos válidos para placas de 96 pocillos: GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems) y DNA Engine Dyad® (MJ) que se utilizaron indistintamente según su disponibilidad en el laboratorio.



-TERMOCICLADORES UTILIZADOS EN LA SECUENCIACIÓN DEL GEN CFTR.

Las condiciones seleccionadas para llevar a cabo la amplificación simultánea de todos los fragmentos del gen CFTR se pueden ver en el siguiente esquema:



-CONDICIONES PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN CFTR.

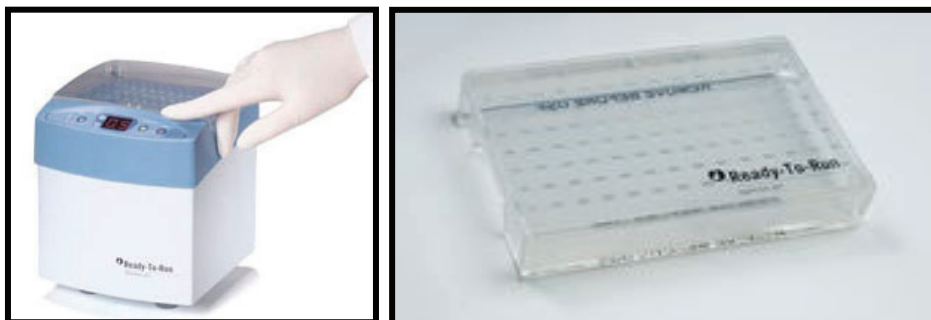
Como se puede observar, la PCR parte de una desnaturalización inicial a 95°C de 2 minutos, para proseguir con 35 ciclos de desnaturalización/hibridación/extensión (94°C, 1 min / 55°C, 1 min / 72°C 1 min) y finalizar con un ciclo de extensión final a 72°C durante 7 minutos. La duración aproximada de la misma es de 2 horas y media.

III.1.1.4.- COMPROBACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO

Para comprobar el producto amplificado se utilizaron geles de agarosa del dispositivo READY-TO-RUN de AmershamBiosciences. En algunas ocasiones, en caso de necesitar una mayor precisión, se utilizaron también geles de poliacrilamida del dispositivo PHASTSYSTEM de Pharmacia.



-DISPOSITIVO PHASTSYSTEM.



-DISPOSITIVO READY-TO-RUN.

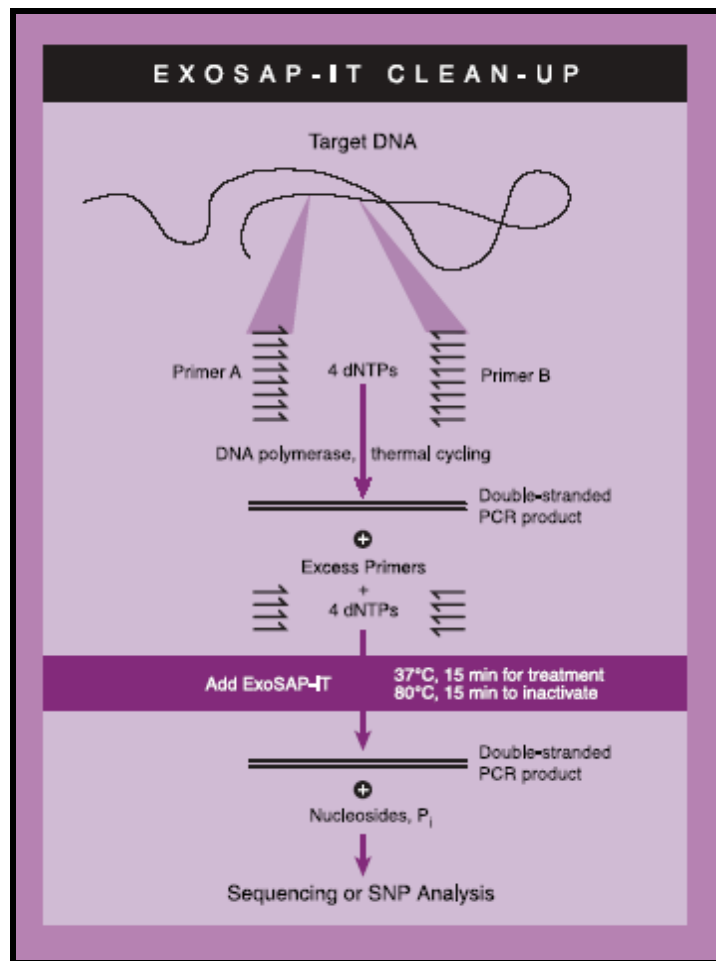
III.1.1.5.- PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO

Una vez hecha la comprobación, los ADNs amplificados se sometieron a una reacción en la que se eliminaron las posibles impurezas. Para ello se utilizó el reactivo EXOSAP-IT® de USB. El EXOSAP-IT consigue preparar el ADN amplificado para una mejor secuenciación. Está compuesto por dos enzimas hidrolíticas, exonucleasa I recombinante y fosfatasa alcalina de camarón (*Pandauls borealis*), formuladas en un tampón especial. La exonucleasa degrada los residuos monocatenarios de los *primers* o de cualquier otro ADN producido en la PCR mientras que la fosfatasa se encarga de hidrolizar los dNTPs sobrantes de la mezcla de PCR.

Las cantidades utilizadas para esta reacción fueron 0,5 μL de producto amplificado y 0,25 μL de exosap-it. En ensayos iniciales se utilizaron 0,85 μL de exosap-it y 2,15 μL de producto amplificado (el fabricante recomienda 5 μL de ADN y 2 μL de exosap-it) pero posteriormente se consiguieron reducir las cantidades hasta las citadas

anteriormente con las consecuentes ventajas económicas sin por ello perder calidad en las secuencias.

Para llevar a cabo esta reacción, el termociclador mantiene la placa a 37°C durante 15 minutos (fase de tratamiento) y posteriormente a 80°C otros 15 minutos (fase de inactivación).



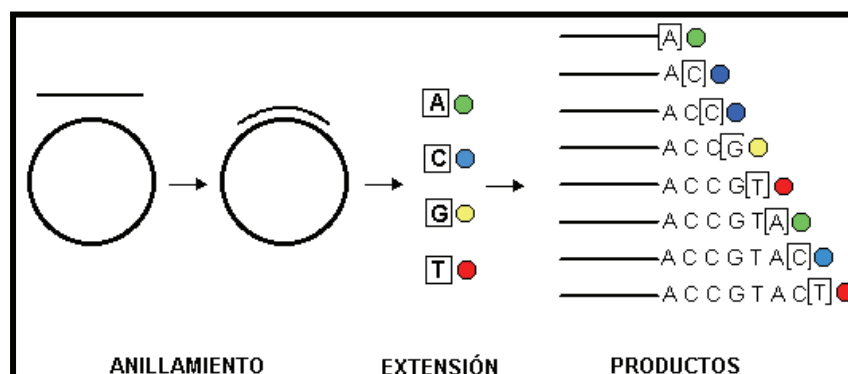
-ESQUEMA DE ACTUACIÓN EN LA REACCIÓN DE EXOSAP-IT.

III.1.1.6.- REACCIÓN DE SECUENCIA

Finalmente se lleva a cabo la reacción de secuencia previa a la secuenciación automática, para la cual se utiliza el BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). Las cantidades de reactivos utilizadas fueron las siguientes:

- ADN purificado: 0,5 μ L
- *Primer*: 1 μ L
- BigDye Terminator v3.1 Sequencing *Buffer* (5x): 1,75 μ L
- Agua MQ: 6,25 μ L
- BigDye Terminator v3.1: 0,5 μ L

La reacción de secuencia se fundamenta en el método enzimático de Sanger. En dicho método se utilizan análogos dideoxirribonucleótidos (que carecen de grupo 3'OH) que se incorporan a la cadena creciente de ADN compitiendo con los nucleótidos normales y actuando como terminadores dando lugar a un bloqueo en la síntesis de la cadena. Al incorporarse de manera aleatoria se van a crear un conjunto de fragmentos de ADN de diferentes longitudes complementario al molde de ADN que está siendo secuenciado.



-FRAGMENTOS FORMADOS DURANTE LA REACCIÓN DE SECUENCIA.

En nuestro caso, al procesar en un secuenciador automático los productos de esta reacción, en vez de usar isótopos radiactivos para marcar los fragmentos de ADN se utilizan terminadores marcados con fluoróforos diferentes (incluidos en los reactivos del kit). Esta técnica es más sencilla pues permite llevar a cabo la reacción en un solo pocillo en el que se añaden los cuatro terminadores marcados.

Las condiciones para la reacción de secuencia fueron: desnaturalización inicial de 96°C (3 minutos) y 25 ciclos de 96°C (30 segundos) / 50°C (15 segundos) / 60°C (4 minutos).

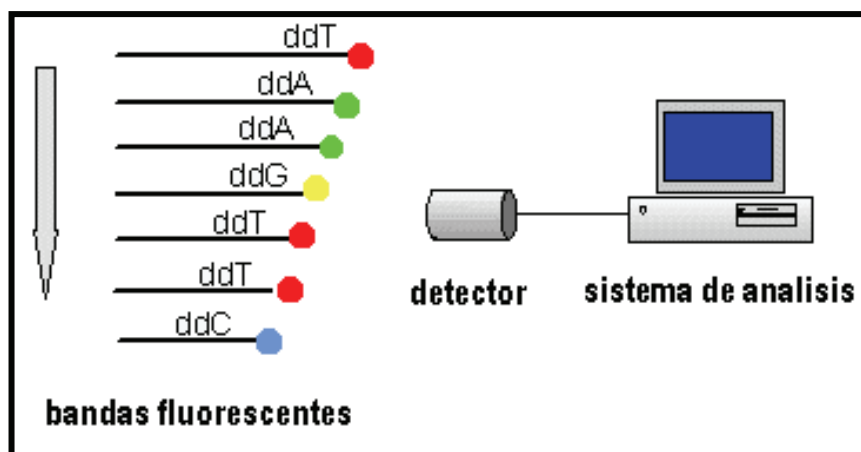
III.1.1.7.- PURIFICACIÓN PREVIA A LA SECUENCIACIÓN

Antes de introducir la placa en el secuenciador se somete a una última purificación del producto resultante de la reacción de secuencia. Para ello se utiliza el KIT MONTAGE SEQ₉₆ ® de Millipore.

Se realizan dos lavados de la placa mediante vacío, uno con 25 µL de solución de inyección y el segundo con 40 µL. Finalmente se añaden 25 µL de solución y se introduce la placa en un agitador durante 15 minutos. Tras la agitación se transfiere ya el producto a la placa que va al secuenciador.

III.1.1.8.- SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

Finalmente ya tenemos las muestras preparadas para que se introduzca la placa en el secuenciador automático. El equipo funciona de manera totalmente automática inyectando las muestras en un capilar previamente cargado con un polímero que funciona como si fuera un gel de secuencia, permitiendo separar fragmentos de ADN de cadena sencilla que se diferencian en una única base. A una altura determinada el láser del dispositivo detecta la fluorescencia emitida por cada cadena sencilla de ADN fluorescente y traduce dicha emisión en la secuencia correspondiente.



-LECTURA DE LOS FRAGMENTOS PROCEDENTES DE LA REACCIÓN DE SECUENCIA.

En nuestro laboratorio utilizamos el secuenciador ABI 3730xl de Applied Biosystems que posee 96 capilares.



-SECUENCIDOR ABI 3730XL.

III.2.- ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA EL ANÁLISIS DEL GEN CFTR

III.2.1.- CHIPS DE ADN

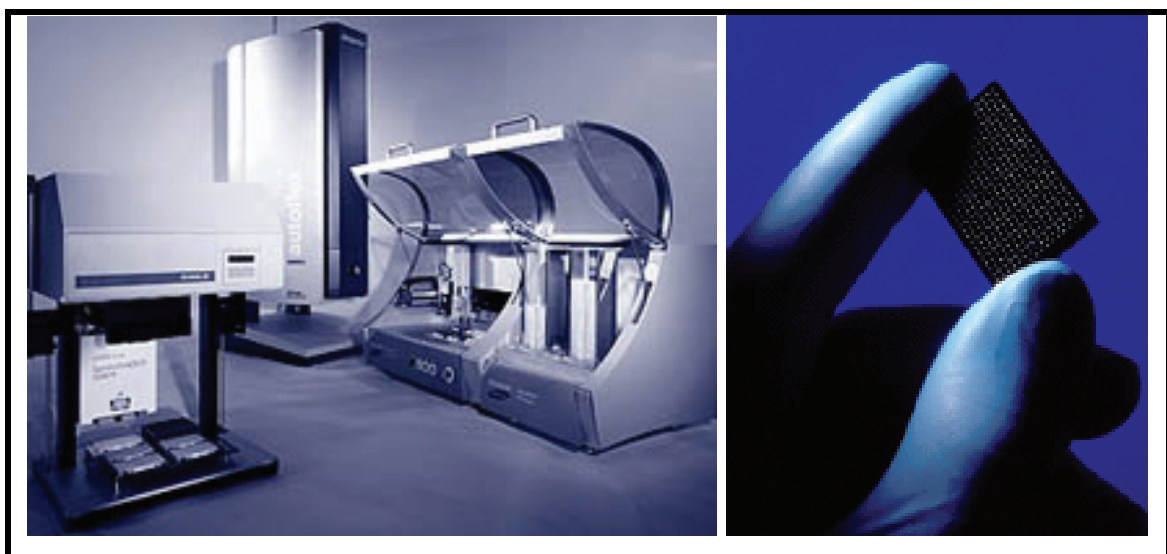
Un chip de ADN (también llamado micromatriz, biochip o *microarray*) consiste en un gran número de moléculas de ADN ordenadas sobre un sustrato sólido de manera que forman una matriz de secuencias en dos dimensiones. Estos fragmentos de material genético suelen ser secuencias cortas llamadas oligonucleótidos o de mayor tamaño como cDNA (ADN complementario, sintetizado a partir de mRNA), o bien productos de PCR. A estos fragmentos de ADN de una sola hebra inmovilizados en el soporte, se les denomina a menudo *sondas*. Los ácidos nucleicos de las muestras a analizar se marcan por diversos métodos (enzimáticos, fluorescentes, etc.) y se incuban sobre el panel de sondas, permitiendo la hibridación (reconocimiento y unión entre moléculas complementarias) de secuencias homólogas. Durante la hibridación, las muestras de material genético marcadas, se unirán a sus complementarias inmovilizadas en el soporte del chip, permitiendo la identificación y cuantificación del ADN presente en la muestra (mutaciones, patógenos, etc.). Con posterioridad, el escáner u otras herramientas informáticas permiten la interpretación y análisis de los datos obtenidos.

Aunque la tecnología que hemos desarrollado, y que será descrita a continuación, no se ajusta de un modo estricto a la definición de chip de ADN (especialmente hasta el momento de la hibridación) hemos decidido denominarla así (Chip-CFTR) por sus semejanzas con la misma.



**-CHIPS UTILIZADOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE FIBROSIS QUÍSTICA
(SpectroCHIP®).**

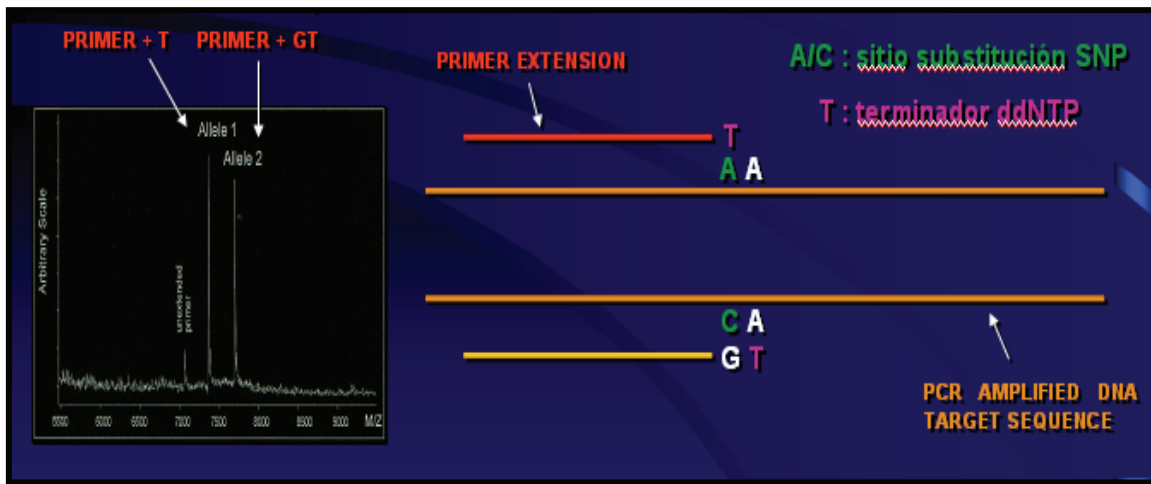
La existencia de un nodo del Centro Nacional de Genotipado (CeGen) en Santiago de Compostela supuso una ventaja por su accesibilidad desde nuestro laboratorio lo cual nos facilitó la introducción de esta tecnología en el programa piloto de cribado neonatal para la FQ. Concretamente la tecnología seleccionada para llevar a cabo nuestro proyecto fue la del sistema SEQUENOM MassARRAY®.



-SISTEMA SEQUENOM MASSARRAY®.

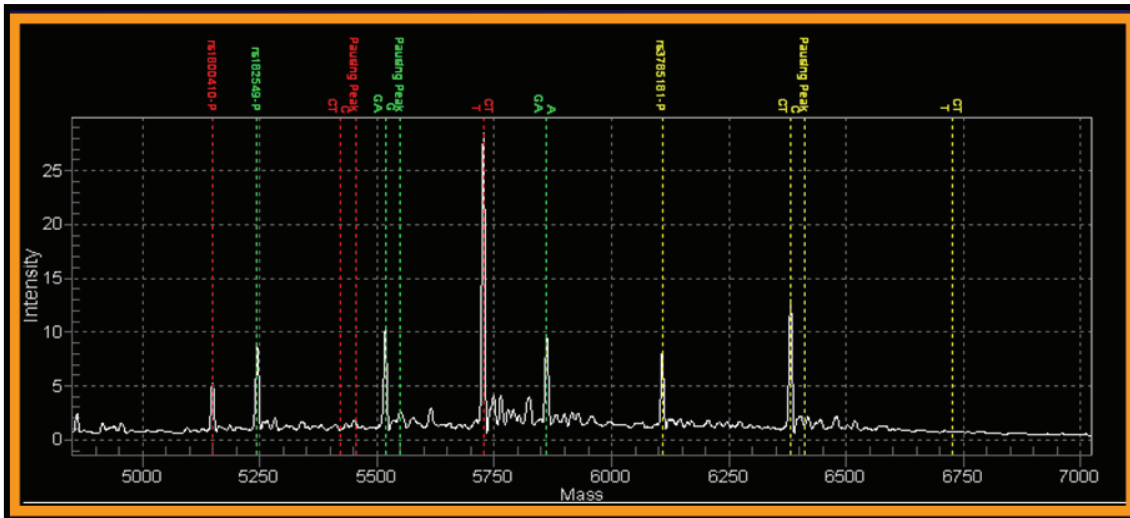
III.2.2.- FUNDAMENTOS DE LA TECNOLOGÍA SEQUENOM MASSARRAY®

El sistema SEQUENOM MassARRAY® se basa en una reacción de *MassExtend* en la que se produce una extensión del *primer* alelo específica. El *primer* hibrida próximo al sitio con la mutación y da lugar a una extensión en función de la mutación de una, dos o tres bases:



- EJEMPLO: EXTENSIÓN DE UNA BASE PARA EL ALELO SALVAJE (ARRIBA) Y DE DOS PARA EL MUTANTE (ABAJO), GENERANDO UN PRODUCTO DISTINTO DE MAYOR MASA.

Como resultado final se obtiene un espectro de masas de los múltiples productos obtenidos empleando *primers* de extensión de diferentes longitudes en una única reacción, lo que genera grupos de picos lo suficientemente espaciados para su identificación:



-EJEMPLO DE REACCIÓN PARA TRES MUTACIONES: GENOTIPADO COMO T, GA, C. (LOS PICOS "P" SON *PRIMERS* DE EXTENSIÓN NO EXTENDIDOS).

Este esquema de funcionamiento se corresponde con la tecnología hME que fue utilizada en el desarrollo de la primera versión del chip. Para diseños posteriores se utilizaría la tecnología iPLEX (una evolución de la anterior), que a diferencia de hME se basaba en una reacción de extensión de base única y que permitió crear ensayos en los que se podían analizar simultáneamente más mutaciones reduciendo así los costes.

III.2.3.- SELECCIÓN DE LAS MUTACIONES

El primer paso que se tuvo que dar a la hora de diseñar el chip fue el de seleccionar las mutaciones que nos interesaba incluir en él. La FQ es una patología para la que, como se ha citado anteriormente, existen descritas en la actualidad más de 1400 mutaciones. Surgió entonces el problema de elegir las mutaciones que nos interesaban ya que resultaba inviable analizarlas todas debido al coste.

Las mutaciones incluidas en el chip se seleccionaron teniendo en cuenta diferentes datos:

En primer lugar se tuvo en cuenta la información existente en la base de datos del *Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium*

(www.genet.sickkids.on.ca/cftr/ConsortiumDataPage1.html) acerca de las mutaciones más frecuentes en Caucásicos.

Además se utilizaron los datos provenientes de la literatura más relevante acerca de las mutaciones existentes en población europea y española (Estivill X *et al*, 1997; Casals T *et al*, 1997; Bobadilla *et al*, 2002; Alonso MJ *et al*, 2007).

Por otro lado, se tuvieron en cuentas las recomendaciones de genotipado de la *European Cystic Fibrosis Society*, las de la *American College of Medical Genetics* y la cobertura de kits comerciales de uso frecuente como el Inno-lipa.

Finalmente, se tuvieron en cuenta los datos que iban apareciendo en nuestros análisis sobre las mutaciones en población gallega con FQ.

Hay que destacar que en los chips, además de mutaciones, se incluyeron también polimorfismos que fueron introducidos por diversos motivos. Así, la politimina (poliT) del intrón 8 se introdujo para aportar información en el caso de aparecer la mutación R117H. Los SNPs I506V, I507V y F508C se introdujeron para evitar la confusión de genotipado con otras mutaciones. Por último, otros SNPs como 1716G/A, 2694T/G ó 1540A/G se introdujeron por motivos poblacionales por su alto grado de variación como control interno de las muestras.

III.2.4.- UBICACIÓN DE LAS MUTACIONES

Uno de los procesos más engorrosos en la creación del chip resultó ser la identificación y ubicación inequívoca de cada una de las mutaciones que queríamos que formara parte del chip. La información que necesitaba el CeGen para poder realizar los diseños preliminares del chip consistía en la secuencia flanqueante de la mutación así como el tipo concreto de cambio (inserción, delección, sustitución nucleotídica...).

Microsoft Excel - TABLAPARAMALDITOFDEFINITIVA

Tahoma

Archivo Edición Ver Insertar Formato Herramientas Datos Ventana ?

Escriba una pregunta

100%

Exon	Mutación	Secuencia
74	EX 17A 70 Y1014C	AGATCCTATATCTAAAAATAAAATAAAATGAATAAATGTGAGCATGTGCAGCTCCTGCAGTTTCTAAAGAATATAGTTCTGTTTCAGTTTCTGTG
75	EXON 2 71 S42F	AAACACAATAAAAAATTTGAAATAACATTACATATTTAGGGTTTTCTTCAAAATTTTAAATTAATAAAGAACAACTCAATCTCTATCAATAGTGAGAA
76	EXON 15 72 M952I	AACATATCTATTTTCTTGCAATAATAGTATGATTTTGAAGTTAAGGGTGCCTCTCTCTAATGCAAAATATGTAATTTAGACTCAAGTTTATGTTCC
77	EX 17B 73 F1052V	ATTACATGTATTGGAAATTCAGTAAGTAACTTTGGCTGCCAAATAACGATTTCTTATCTCTTACAGCACTGCTCTCAAGACAAAGGGAATAGTAC
78	EXON13 74 R669C	TCATAGTAGAAATAACAGCTATGCAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCTGATTATGTTTATTTCTCGTGGGATAGCCGACACTTTGCTTGCTA
79	EXON 7 75 T351S	TGGGATTCCTCAGAGGTCTACCAGTGGTGACATCTCTAATCAGTGTGCAAAATTTACACCACAAATG/CCTTAAATTCCTGTTCTTCAAGCACCTA
80	EXON 10 76 F508C	TGTCAACCTCAACACGTTGAAAGCAGGTACTTTTACTAGGCTAAGAAATGAAACTGCTGATCCACATCAATAGCGCTGTGGTGTGTTTGTGTTTTC
81	EX 17A 77 S1045V	TAATGGCAGTGTGGCTTTTGCACAGAGGCATGTGCCCTTTGTGAACCTCCATTTGACTGGCATGCATGCTCAGATATATAGGTTATCATATA
82	EXON 19 78 S1235R	TTGTTGCTCCT
83	EXON 15 79 Q890X	Barra de fórmulas: ATGTCCTTTGTAGGGACATGGATGAAATTTGAAACATCATCTTCTCAGTAACTATCGCAAGAACAAAAACCAACACCCGCATATTTCTCAC
84	EXON 13 80 R709X	AGGTAGTTCGAGAGAAAGAGAAGAACTCTTCAGTAGTGGTTTTGAGGTGTGGTACATTTTATTATAATATACCGGTTATACAGCATTTGTCAGTGTGCTCAT
85	INT 18 81 9601-111G-C	GATGACCATAGTTGGGTGAGGTGACACATTCCTGTAGTCTAGCTCCTCCACAGGCTGACGAGGAGGATCACTTTGAGCCAGGAGTTTCAGGGCTGTAGTG
86	EXON 10 82 1609de1CA	CACAAGGTACCAATTTAATTACTACAGAGTACTTTAAGATCATTTTAAAAATAATAAAAAATGTTATGATAGAGATTATATGCAATAAAAATTAACAAAAATG
87	INT 5 83 712-1G-T	GTTCATAGTAATAGATTATATAAGCAGATAAATATTTAAATTTTCAAAATATAACCCCTTATATGCAATTTATTTTCTTACGACTAAAAATGAATTTTAAGTAA
88	EXON 15 84 2869insG	GAATATGTCTCTATTACTTAATCTGTACCTAATAATATGAAGTTAATCTACTTTGTAGGATTTCTGTGAAGATTAAATAAATTAATATAGTTAAAGCACATA
89	INT 11 85 1811-1.8kbA-G	CAGACCTTGCTTCTTTTAAAACTTTAAATCTGTATGTACTTTTGGCCAGATATGATACCTGAGCAATTTCTTGTCTGGGTTGCTTATGTGAAAAATAAAT
90	EXON 6A 86 P205S	AGTGAGTATCCATGTCTCTATTGTGTAGATTGTGTTTTATTTCTGTTGATTAAATTTGTAATCCACTATGTTGTATGATTGTAATCCACTTTGTTTCAT
91	INT 11 87 1812-1G-A	CACAGGCTCTCAAAATAAATGGAAGTTGATTGTTTTTACTCTGAGCCAAAGTAAAGACTTATTCTAAGAAATCCACAAATTTAGATAGATAGATATATGGC
92	EXON 6A 88 V232D	ATTCAAGTCTCTGGGACAGATAATGTGTTTTATTTATCTTTGATATCCATTACTTAAAAACAGCATTTGGACCCACAGCTGGTACAAAAATTAATTACTGTTG
93	EXON 6B 89 936de1TA	CTATCAATTTTGTGATAGTGGTTAAACACTTAGAAAAACATTTTAAAAATAATTCACATAAGTAATGTAATTTATTAGCTGCTCTGACATTTTACAGTTTG
94	INT 10 90 1717-8G-A	TGAATTGAGCAAAATTTATTCTAAATGTCTCTGCAAAATGACAGAGTGTGGTTGTGGATTAAAGTCCCTGGAAGAGTCTCTTTGTTCTCTCATGTTCTAT
95	EX 13 91 1949de18A	GTAGAGTTTATTAGCTTTTACTACTCTGTTTTATGGATCATCACACAGAGCCTTAGTTACTTTGTGTTACAGAATAACTAATATGAGTGAATGAATGACTT
96	EX 17B 92 W1089X	AATGAGGTGCTGAGGATGGACAGAGGAAGAAAGCTGTTTTAGTTGGGAGGATAGGTGACAGAAGCATGGAAGGAATTTGCTTGGACCCATGGAAGGCCAGTG
97	EXON 11 93 L558S	CTTAAGTAAACACTTGAGAAATAAATGATGGTCAACCTAAAAATGTAAGAAAGAAATTAATAGAAATTTAAAGAGCAACAAAGCTCTGACATTTAAAAAGA
98	EXON 12 94 A561E	AGCTGTTAGGGAATCACATTTTGCAGTGACAGCCTTAGTGTGGGTGCATTTTCAGGCAATACTTTTCAGTATATTTCTGCTTTGTAGATTATAGCTAAAT
99	EXON 13 95 2608de1T	TAGCTTGACAGAAGCATGGAAGGAATGGCTTGGACCCATGGAAGCCAGTGAAGATACTTAGATCCTGCAGGGGTGTGAATAATGTTCTTTTATGTTCTCT
00	EX 17B 96 Q1100P	TGGAATAGTTTATTTCTTTTGGTGCTCTACCAAAACCAACATCTTCAAGGGCAGGAAGCTGTATAATTTTGGCCATTGTTATTTGAGCACATAGCATGG
01	EXON17B 97 M1101K	ATATTAATTTTGCATGAAGGTAGCAGCTATTTTATGGGACATTTTCAGAACTCCAAATCTACAGCCAGACTTTAGCTCAAAACCTCATGGGATGTGATTCT
02	EXON 20 98 G1244E	AGCTGTTAGGGAATCACATTTTGCAGTGACAGCCTTAGTGTGGGTGCATTTTCAGGCAATACTTTTCAGTATATTTCTGCTTTGTAGATTATAGCTAAAT
03	EXON 1 99 P5L	CCAAAGTACTCATTCACTGAGGAGTGGTAAGGCCTTCGCCAACCTGCCTTCTGCGGAATATCTGCTGCCTGAGCAATCATATTGTTTATTGCCAGGCTTG
04	EXON 2 100 Q30X	AATTGGAAGCAATGACATCACAGCAGGTGACAGAAAAAGGGTTGAGCGGCAAGGCCAGAGTAGTGTCTTTGGCATTTAGGAGCTTGAGCCAGACGCGC
05	EXON 4 101 E92K	TTCTTTCAATGAATGACTCATTACTGAGTATGCATGCTACAGTAAACAAAAATATATAAGGCTGTTGATTAAATGTTGATTAAAGTGCATGCTTATTCAGAGT
06	EXON 4 102 A120T	TCTGAAAAATAATGCCATTGACACAAAAACATTTTGAAGTTCTAGTTTGAATACATCAGGTCACTTGGTCTGTGGCCTCAGTTTCTTCACTGCCATGT
		GTGAAAAATAATGCCTACTCTGTAGCAAGAAAGTCTCTATAGTAAACAAAAAGCCTACTCTGACTGAAAGTTGTTATGAAAAATAAAAAAGGG

LISTA MUTACIONES DEL2,3(21KB) ALFABETICAMENTE

-EJEMPLO DE TABLA EXCEL CON LAS MUTACIONES EN EL FORMATO NECESARIO PARA REALIZAR LOS DISEÑOS (SEÑALADA MUTACIÓN G>C).

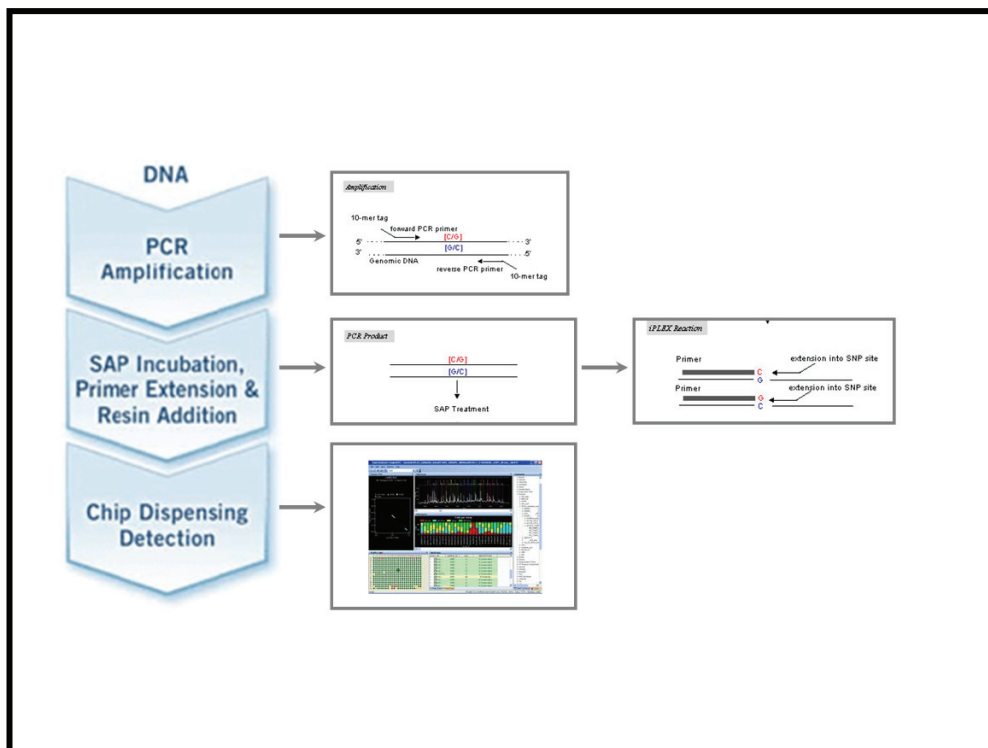
Un problema muy frecuente en el campo de la genética a la hora de buscar las mutaciones es el de la identificación inequívoca de las mismas. Aunque existen publicadas recomendaciones para que haya un sistema de nomenclatura universal que no dé lugar a confusión (den Dunnen JT y Antonarakis E, 2001), no todas las recomendaciones han sido aceptadas de forma general y, además, para las mutaciones nombradas con anterioridad a estas reglas prevalece su denominación original. Todo ello complicó mucho la identificación de las mutaciones, siendo necesario en varias ocasiones llegar a la publicación original para cerciorarse del cambio genético.

Poco a poco, basándose principalmente en la información ofrecida por la base de datos del *Cystic Fibrosis Genetic Consortium*, se fueron reconociendo las distintas mutaciones hasta lograr ubicarlas una a una dentro de la secuencia del gen CFTR.

Tras crear una tabla *Excel* con los datos de las secuencias de las mutaciones que se querían genotipar, se utilizó el programa MassArray ASSAY DESIGN v3.0 (Sequenom®) para crear ensayos con el mayor número de mutaciones posibles teniendo en cuenta estimaciones sobre la ubicación de los espectros que se iban a generar y que fuera compatible su lectura. Tras obtener los diferentes diseños de los ensayos se pidieron los *primers* a la casa Metabion.

III.2.5.- METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE GENOTIPOS

Los principales pasos que se realizan para obtener genotipos mediante la tecnología iPLEX se pueden observar resumidos en el siguiente esquema:

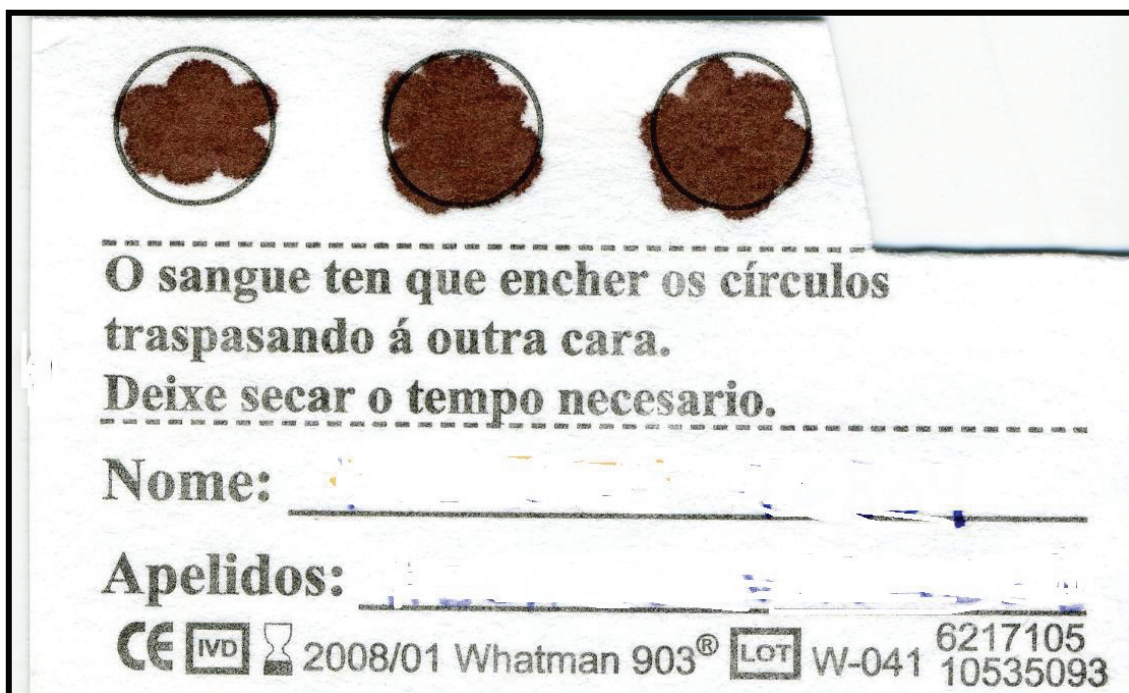


-ESQUEMA DE LOS PROCESOS PARA EL GENOTIPADO MEDIANTE IPLEX.

Inicialmente el ADN se amplifica y se purifica mediante incubación con SAP. Luego se realiza la reacción de extensión y finalmente se añaden resinas y agua para eliminar sales que puedan interferir en la lectura. Por último el producto se puntea en el chip que es introducido en el espectrómetro. Los espectros resultantes se analizan mediante un programa informático que nos facilita su interpretación.

III.2.5.1.- EXTRACCIÓN DEL ADN

En este caso el ADN se obtiene generalmente de manchas de sangre procedentes de los neonatos recogidas en papel de filtro Schleicher & Schuell 903® (6x9 cms).



-MANCHAS DE SANGRE RECOGIDAS EN PAPEL DE FILTRO.

La extracción de ADN se lleva a cabo por el método del fenol-cloroformo según el siguiente protocolo:

- Se corta la mancha de sangre en pequeños trozos (1 cm² aproximadamente) que se introducen en un Eppendorf al que se añade 500

μL de tampón DLB (constituído con 100 μL de TRIS/HCL 1M pH 7,4, 20 μL de NaCl 5M, 200 μL de EDTA 0,5 M pH 8,0 y 9,7 ml de agua destilada).

- Posteriormente se añaden 50 μL de SDS al 10% y 5 μL de proteinasa K (20mg/ml) y se deja incubando a 56°C toda la noche.

- Al día siguiente se añaden 20 μL de NaCl 5M, 250 μL de fenol-cloroformo y 250 μL de alcohol isoamílico 24:1 y se mezcla por inversión.

- Se centrifuga 3 minutos a 12000 rpm y se pasa la fase acuosa (superior) a otro tubo, cortando la punta de la pipeta para evitar la fragmentación del ADN.

- Posteriormente se añaden de nuevo 250 μL de fenol y 250 μL de alcohol isoamílico y se centrifuga 3 minutos a 12000 rpm.

- Se recoge la fase acuosa nuevamente pasándola a otro tubo y se añade 1 mL de etanol absoluto frío. Se agita por inversión y se deja 30 minutos a 80°C bajo cero.

- Finalmente se centrifuga a 12000 rpm 15 minutos, se decanta el sobrenadante con la pipeta y se deja secar 10 minutos. Se añaden 30 μL de solución de rehidratación (Promega) y se incuba en un baño con agitación a 65°C durante 1 hora.

III.2.5.2.- CUANTIFICACIÓN DEL ADN Y NORMALIZACIÓN

El ADN se cuantifica mediante el espectrofotómetro NANODROP ND-1000 y posteriormente se normalizan las muestras a 10 ng/μL utilizando una macro de *Excel*. La tabla de normalización nos permite saber el volumen de muestra necesario para la realización simultánea de los diferentes ensayos a la concentración adecuada para el análisis. En nuestro caso, teniendo en cuenta los ensayos del chip, el volumen mínimo necesario para cada muestra era de 70 μL (versión 2007).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
2			MUESTRAS CFTR DIAGNÓSTICO CHIP 23 (PL-CFTR-07-0015)											
3		Sample	DNA Conc. (ng/μl)	add 2 ul DNA y:	add 2,5 ul DNA y:	add 3 ul DNA y:	add 4 ul DNA y:	add 5 ul DNA y:	add 6 ul DNA y:	add 8 ul DNA y:	add 10 ul DNA y:	add 15 ul DNA y:		
4		7D362	257,9	49,6	62,0	74,4	99,2	124,0	148,7	198,3	247,9	371,9		
5		7D363	161,9	30,4	38,0	45,6	60,8	76,0	91,1	121,5	151,9	227,9		
6		7D364	355,7	69,1	86,4	103,7	138,3	172,9	207,4	276,6	345,7	518,6		
7		7D402	441,4	86,3	107,9	129,4	172,6	215,7	258,8	345,1	431,4	647,1		
8		7D403	348,6	67,7	84,7	101,6	135,4	169,3	203,2	270,9	338,6	507,9		
9		7D404	130,9	24,2	30,2	36,3	48,4	60,5	72,5	96,7	120,9	181,4		
10		7D405	272,6	52,5	65,7	78,8	105,0	131,3	157,6	210,1	262,6	393,9		
11		7D431	63	10,6	13,3	15,9	21,2	26,5	31,8	42,4	53,0	79,5	c1	
12		7D500	281,3	54,3	67,8	81,4	108,5	135,7	162,8	217,0	271,3	407,0		
13		7D501	248,7	47,7	59,7	71,6	95,5	119,4	143,2	191,0	238,7	358,1		
14		7D502	172,1	32,4	40,5	48,6	64,8	81,1	97,3	129,7	162,1	243,2		
15		7D503	146,7	27,3	34,2	41,0	54,7	68,4	82,0	109,4	136,7	205,1		
16		7D504	198,6	37,7	47,2	56,6	75,4	94,3	113,2	150,9	188,6	282,9		
17		7D514	194,4	36,9	46,1	55,3	73,8	92,2	110,6	147,5	184,4	276,6		
18		7B931	156,5	29,3	36,6	44,0	58,6	73,3	87,9	117,2	146,5	219,8		
19		AGUA											c2	
20														
21			1	2	3	4	5	6						
22		A	7D362	7D500										
23		B	7D363	7D501										
24		C	7D364	7D502										
25		D	7D402	7D503										
26		E	7D403	7D504										
27		F	7D404	7D514										
28		G	7D405	7B931										
29		H	7D431	AGUA										
30														

- EJEMPLO DE TABLA DE NORMALIZACIÓN PARA LAS MUESTRAS DE UN CHIP.

Teniendo en cuenta estos datos se prepara una placa con las muestras a la concentración adecuada (añadiendo el ADN y el agua necesarios en cada caso, indicado en la tabla). Posteriormente el CeGen inicia con esta placa el proceso de genotipado.

III.2.5.3.- AMPLIFICACIÓN DEL ADN

El ADN se amplifica en una reacción PCR *multiplex* que tendrá distinto número de *primers* según las mutaciones que se analicen en cada ensayo.

Las cantidades utilizadas para la reacción de amplificación de cada muestra fueron las siguientes :

- Agua MQ: 53 μL.
- PCR *Buffer* (10x): 27,6 μL.
- MgCl₂ (25 nM): 14,4 μL.

- dNTP mix (25mM): 11,0 µL.
- Hot Star Taq polimerasa (5 U/µL): 4,4 µL.
- *Primer* mix (1 µM); 22,1 µL.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C 15 min, 45 ciclos de 94°C 20 seg / 56°C 30 seg / 72°C 1 min y por último 72°C 3 minutos.

III.2.5.4.- TRATAMIENTO CON SAP

Tras la amplificación se lleva a cabo una reacción de purificación utilizando el reactivo SAP (*Shrimp alkaline phosphatase*) que cataliza la defosforilación 5' fosfato de los extremos del ADN amplificado. Las cantidades utilizadas para cada placa fueron:

- Agua MQ: 765 µL.
- *Buffer*: 85 µL.
- SAP: 150 µL.

Las condiciones del termociclador para la reacción fueron 37°C durante 40 minutos y 85°C durante 5 minutos.

III.2.5.5.- REACCIÓN DE EXTENSIÓN

Una vez que tenemos el producto amplificado purificado, se procede a realizar la reacción de extensión iPLEX, para la que se utilizan diferentes cantidades de reactivos según en el ensayo se lleven a cabo 18 genotipos o más:

- De 1 a 18 genotipos :
 - Agua MQ: 32,6 µL
 - Stop Buffer*: 8,8 µL
 - iPlex mix*: 4,4 µL
 - Extend Primers*: 41,5 µL
 - Enzima iPlex-Gold: 0,9 µL

- De 19 a 36 genotipos :
 - Agua MQ: 27,3 μ L
 - Stop Buffer*: 8,8 μ L
 - iPlex mix*: 8,8 μ L
 - Extend Primers*: 41,5 μ L
 - Enzima *iPlex-Gold*: 1,8 μ L

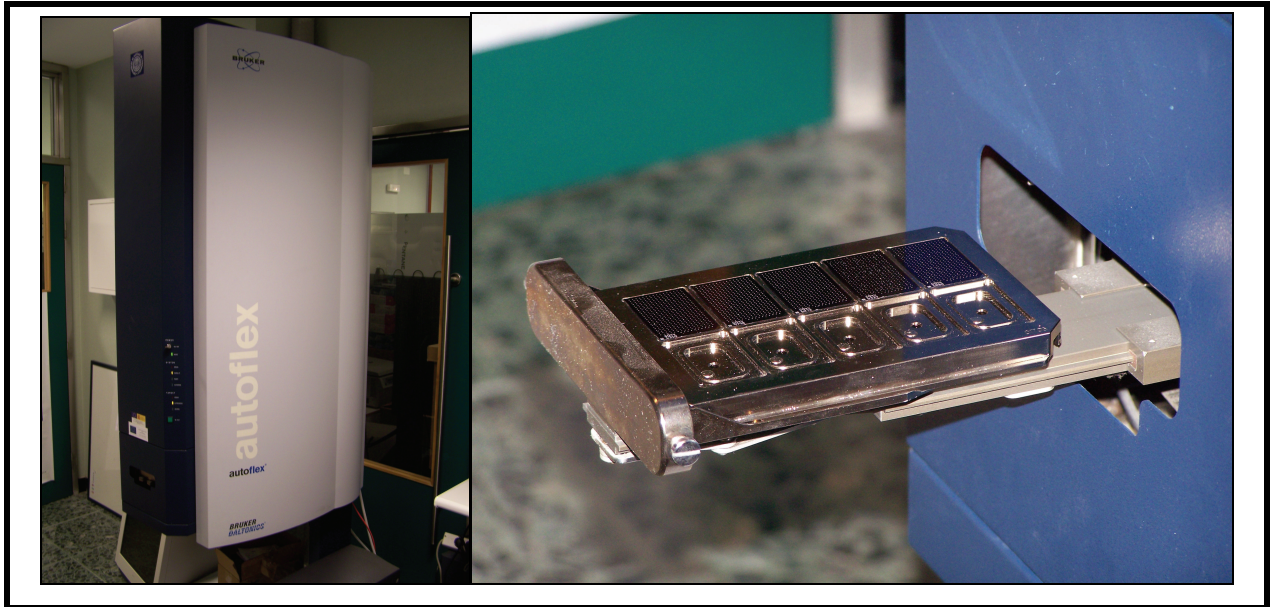
Las condiciones del termociclador para la reacción de extensión fueron las siguientes:

- Desnaturalización inicial: 94°C 30 segundos.
- 40 ciclos de desnaturalización-hibridación-extensión :
94°C 5 seg / 52°C 5 seg / 80°C 5 seg / 52°C 5 seg / 80°C 5 seg / 52°C 5 seg / 80°C 5 seg / 52°C 5 seg / 80°C 5 seg / 52°C 5 seg / 80°C 5 seg
- Extensión final: 72°C 3 minutos.

III.2.5.6.- HIBRIDACIÓN EN CHIP Y LECTURA

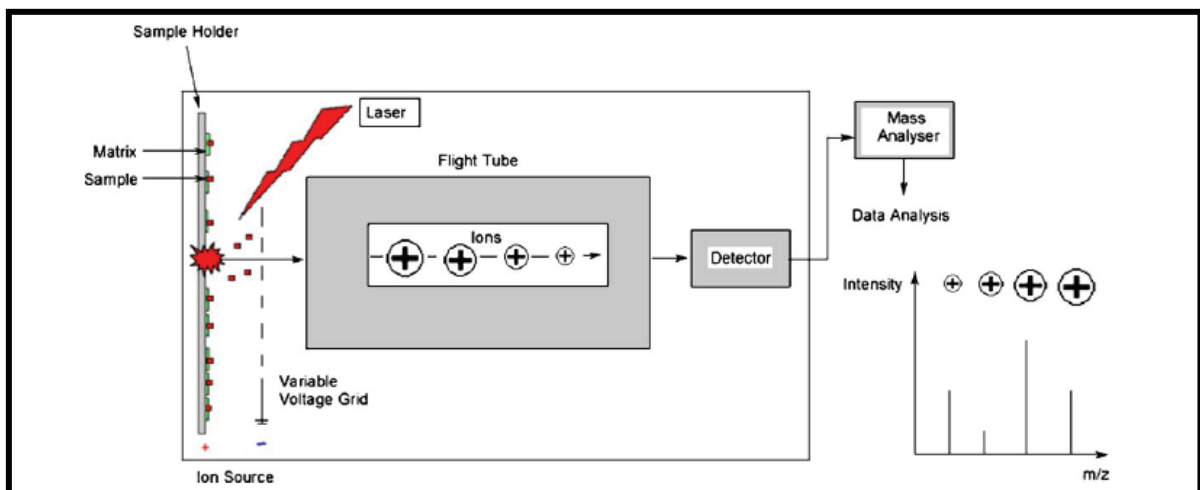
Tras la extensión, el producto resultante en cada pocillo se diluye en 15 μ L de agua MQ y se le añade 6 mg de resinas de purificación (Clean Resin Sequenom®) con la finalidad de eliminar las sales de los productos resultantes de la reacción. Después se agita 15 minutos y se centrifuga para introducir la placa en el robot dispensador (Nanodispenser) que se encarga de coger el volumen necesario para hibridarlo en el chip (SpectroCHIP®) así como de añadir el calibrante necesario para el espectrómetro.

Finalmente el chip se introduce en el espectrómetro (Autoflex Bruker Daltonics) donde se realiza la lectura del mismo.



-ESPECTRÓMETRO E INTRODUCCIÓN DE CHIP PARA LECTURA.

El fundamento del análisis de ácidos nucleicos mediante un espectrómetro MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry*) puede verse esquematizado a continuación (Sauer S, 2006):



-ESQUEMA DE FUNCIONAMIENTO DE UN ESPECTRÓMETRO MALDI-TOF.

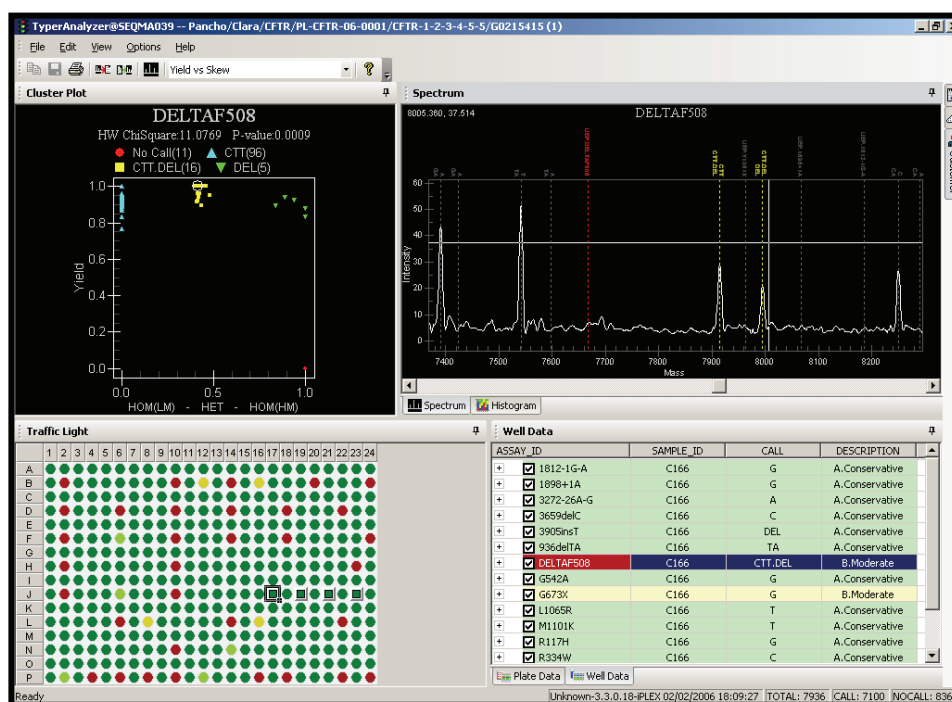
La irradiación de co-cristales formados por pequeñas moléculas ácidas orgánicas (la matriz) y biomoléculas con una láser pulsante (generalmente láser UV) induce una transferencia de energía y un proceso de desorción, evaporando la matriz y los iones del analito en una fase

gaseosa. Tras la ionización, las moléculas de la matriz y el analito son aceleradas mediante un campo eléctrico.

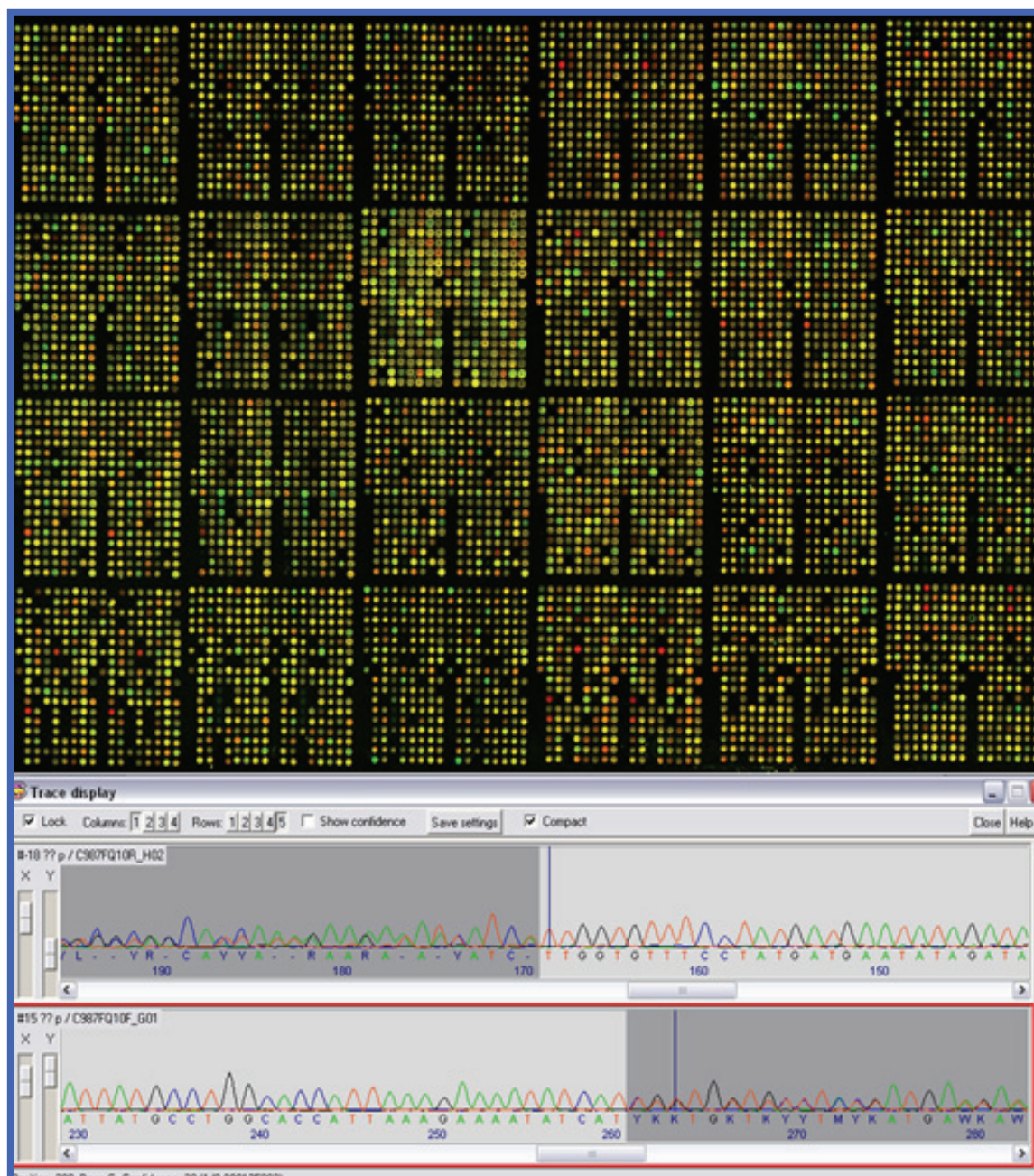
Generalmente la espectrometría de masas MALDI-MS se lleva a cabo con una separación *time-of-flight* (tiempo de vuelo). En ella, las moléculas son guiadas mediante óptica iónica por un tubo en vuelo libre de campo, donde se separan según sus relaciones masa/carga antes de que, finalmente, lleguen al detector. La interpretación de los espectros y la identificación de las mutaciones se lleva a cabo mediante algoritmos como los descritos por Bocker (Bocker S, 2003).

III.2.5.7.- ANÁLISIS DE DATOS

Por último, los datos procedentes del espectrómetro se analizan mediante el programa TyperAnalyzer (Sequenom®). Con dicho programa podemos visualizar cada uno de los espectros de las muestras a la vez que revisamos la asignación automática de genotipos que efectúa.



-VISUALIZACIÓN DE ESPECTROS MEDIANTE EL PROGRAMA TYPERANALYZER.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1.- DESARROLLO DE UNA TECNOLOGÍA DE ALTO RENDIMIENTO PARA EL GENOTIPADO DE CFTR

IV.1.1.- DISEÑOS DE CHIPS-CFTR

En el año 2006 se concluye el desarrollo de la primera versión del Chip-CFTR, que comienza a utilizarse de manera rutinaria en el programa piloto de cribado neonatal para FQ que se había iniciado tres años antes en la Unidad de Metabolopatías del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS). La utilización de esta tecnología de alto rendimiento trató de solucionar los inconvenientes de la secuenciación, que se venía utilizando como método analítico en nuestro laboratorio desde el año 2003, y sus características específicas mostraron a esta tecnología durante los años siguientes como muy adecuada para el diagnóstico genético de la enfermedad y más concretamente para su aplicación en programas de cribado.

Tras diversos ajustes en las condiciones de los ensayos con el fin de intentar analizar el mayor número de mutaciones en un mismo chip, desarrollamos una primera versión del Chip-CFTR (Chip-CFTRv2006) en la que se analizaban las siguientes variantes (mutaciones y polimorfismos) del gen CFTR, mediante los ensayos que se muestran a continuación (SNPs en **negrita**):

ENSAYOS	VARIANTES
lplex1	D1270N, R553X, DEL21k1, Q890X, 1717-1A, G1244E, 405+3C, 2789+5G-A, R709X, R347H, E92K, G576A, 3199del6, F1074L, R1158X, 3849+10KbC-T, P205S, 621+1G-T, 875+1G-A, V232D.
lplex2	W1282X, L206W, S549R, E692X, R668C, 2869insG, N1303K, G480C, S1251N, 3601-111G-C , R75Q , G314E, 3849+4G, Y1014C, L997F , A120T, ΔI507, R1066C, D1152H, T351S , S42F, 3120+1A.
lplex3	2143delT, 712-1G-T, 4005+1G-A, R117C, K710X, 3876delA, S1045Y, A1006E, F508C , 1898+3A-G, R75Q , I807M , I148T, R352Q, W1089X, A561E, Q493X, M952I, 1717-8G-A, 711+5G-A, 2603delT, P5L.
lplex4	Q1100P, R1162X, V520F, E60X, 1078delT, 2183AA-G, Q1313X, 3860ins31, Y122X, R347P, G178R, 405+1A, A559T, 1811+1.6kbA-G, F1052V, L967S , L571S, R851X, 711+3A-T, S1235R, 1609delCA.
lplex5	G673X, G542A, R74W, L1065R, R334W, 3659delC, 936delTA, 3905insT, 3272-26A-G, R117H, M1101K, ΔF508, Y1381X, 1898+1A, 1812-1G-A.
lplex6	S549N, A455E, Q1281X, 2184insA, F316L, H199Y, V754M, 2184delA, Q30X, Y1092X, 711+1G-T, 3667del4, T582R, 1716G/A , G85E .

- VARIANTES A ESTUDIO EN LA PRIMERA VERSIÓN DEL CHIP-CFTR.

Como se puede observar, nos encontramos ante un panel con 119 variantes, estructurado en 6 ensayos (*plexes*) en los que se analizaban simultáneamente hasta un máximo de 22 variantes. Con esta versión inicial se podían analizar en un mismo chip hasta 28 muestras que se genotipaban por duplicado junto a un control positivo (previamente analizado) y un control negativo (agua MQ). La utilización de esta versión del chip se complementó inicialmente, en el caso de ser necesario, con la secuenciación directa de algunos exones del gen CFTR para obtener información de otras mutaciones que no pudieron introducirse en los ensayos. Los *primers* que se utilizaron para la amplificación y para la reacción de extensión en esta versión del chip pueden verse en el Anexo I.

Tras las pruebas iniciales, esta versión del chip se comenzó a utilizar de forma rutinaria para el análisis genético de muestras de cribado en febrero del año 2006. En total se utilizó durante un período aproximado de un año, en el que se analizaron un total de 409 muestras, incluyendo pruebas iniciales con muestras control previamente genotipadas.

A principios del año 2007, una vez comprobada la eficacia de la técnica, se decide ampliar el número de variantes a estudio teniendo en cuenta la aparición de la nueva tecnología de genotipado *MassARRAY® iPLEX Gold*. Esta tecnología permitió la creación de ensayos en los que se podían analizar simultáneamente más mutaciones, ofreciendo la posibilidad de ampliar la cobertura y mejorar la relación coste-efectividad de nuestro método. Con este nuevo tipo de ensayos se desarrolló el Chip-CFTRv2007, cuyo diseño puede verse en la siguiente tabla:

ENSAYOS	VARIANTES
Iplex 1	D1270N, P205S, 3860ins31, Y913C, 2143delT, Q1313X, 3849+4A-G, 2789+5G-A, F1052V, S1196X, 4521G/A , A120T, A455E, Y1092X, Q890X, 2307insA, P5L, 1717-8G-A, 3199del6, 1716G/A , 1677delTA, S42F, G330X, P67L, 405+1G-A, I807M , 875+1G-A, G551D, 3849+10KbC-T, 2055del9-A, L159S, 444delA, G178R.
Iplex 2	V754M, 3737delA, S549R, S1251N, Y122X, I336K, Y1014C, 621+3A-G, R75X, E217G, D1152H, S364P, 2869insG, 4005+2T-C, W1089X, L1065P, R709X, 1078delT, 711+3A-G, I506V , E92K, S1235R, R668C , L967S , R1158X, del21kb, 2694T/G , POLI-Tn 7/9 , L997F , 935delA, 1811+1.6kbA-G, G576A.
Iplex 3	S549I, R352Q, I148T, F1074L, 852del22, 1540A/G , 3601-111G-C , A1006E, E60X, ΔF508, S1045Y, R117H, 3667del4, D614G, 2043delG, R851L, K710X, V562I, 405+3A-C, 712-1G-T, N1303K, S1255X, 3272-26A-G, F316L, 711+1G-T, 1898+1G-A, 3120+1G-A, Q30X.
Iplex 4	L206W, W57G, G480C, E692X, 4382delA, 4005+1G-A, R1066C, 3659delC, 1154insTC, ΔI507, G551S, M952I, 1342-2A-C, 406-1G-A, G314E, M595I, 1288insTA, M1101K, A561E, 711+5G-A, 1717-1G-A, G85E, W846X, 3905insT.

Iplex 5	S549N, T351S , G1244E, H199Y, V232D, 1609delCA, 3821delT, 991del5, R117C, L1065R, 2176insC, W1282X, G576X, 936delTA, 621+1G-T, 2603delT, R1162X, 4016insT, I507V , R851X, 711+3A-T, G622D.
Iplex 6	Q1281X, R1070Q, R347H, F508C , DEL21kb_2, 1812-1G-A, G673X, DELTAF311, E588V, Q493X, R75Q , G542A, Y1381X.
Iplex 7	R74W, POLI-Tn 5/7 , R347P, 2183AA-G, R553X, E585X.
Iplex 8	G542X, 2184delA, R334W, 394delTT.
Iplex 9	Q1100P, R1066H, 2184insA, R334Q, 3876delA, G85V, T582R, I502T, A559T.
Iplex 10	R560T, V520F, 1898+5G-T.
Iplex 11	Q552X, 1898+3A-G.
Iplex 12	L571S, L558S.

- VARIANTES A ESTUDIO EN LA SEGUNDA VERSIÓN DEL CHIP-CFTR.

Como se puede ver, en esta versión del chip aumentó notablemente el número de variantes a estudio hasta 175. Esta versión se utilizó desde el año 2007 y hasta finalizar ese año se analizaron un total de 350 muestras. La estructura de este chip permite el análisis simultáneo de 14 muestras (ensayo por duplicado) en un mismo chip en el que también se analizan, como en el caso anterior, un control positivo y un control negativo. Los *primers* que se utilizaron para la amplificación y para la reacción de extensión en esta versión del chip pueden verse en el Anexo II.

En el momento de la redacción de esta memoria nos encontramos desarrollando la versión 2008 del chip, en el que se ha intentado aumentar la cobertura de análisis hasta 184 variantes.

IV.1.2.- MUTACIONES IDENTIFICADAS MEDIANTE CHIPS

Durante el período comprendido entre los años 2006 y 2007, en el cual se utilizaron las dos primeras versiones del Chip-CFTR, se genotiparon satisfactoriamente un total de 759 muestras en las que fueron identificadas 52 mutaciones diferentes cuya frecuencia se puede ver en la siguiente tabla:

MUTACIÓN	Nº DE ALELOS
ΔF508	103
G542X	6
L206W	6
Y1014C	6
2184insA	5
R117H	5
V562I	5
F1052V	4
I148T	4
R553X	4
S1235R	4
1811+1.6KB A-G	3
2183AA-G	3
711+1G-T	3
G551D	3
G576A	3
R1162X	3
V754M	3
W1282X	3
1717-1G-A	2
D1152H	2

ΔI507	2
F1074L	2
Q1100P	2
1609delCA	1
2184delA	1
3120+1G-A	1
3272-26A-G	1
3659delC	1
3849+10kbC-T	1
3860ins31	1
3876delA	1
3905insT	1
394delTT	1
621+1G-T	1
711+3A-G	1
D1270N	1
E217G	1
E588V	1
M952I	1
N1303K	1
P205S	1
R1066C	1
R1066H	1
R334W	1
R347P	1
R74W	1
S1045Y	1
S42F	1
S549N	1
V232D	1
Y1092X	1

-MUTACIONES IDENTIFICADAS MEDIANTE CHIPS DURANTE EL PERÍODO 2006-2007.

IV.1.3.- UTILIZACIÓN DE CHIPS EN CRIBADO

IV.1.3.1.- MUTACIONES EN MUESTRAS DE CRIBADO

Hay que destacar que la razón fundamental por la que se decidió desarrollar la tecnología de chips de ADN para el análisis del gen CFTR fue, además de para utilizarse en el diagnóstico de la enfermedad, para poder introducirlo en un programa de cribado.

Como ya se indicó con anterioridad, desde el año 2006 los chips se utilizaron de manera rutinaria dentro del programa piloto para el cribado de la fibrosis quística en Galicia. Desde ese año, y hasta finales del año 2007, se genotiparon un total de 340 muestras de cribado mediante chips, cuyos resultados pueden verse en la siguiente tabla:

MUTACIÓN	Nº DE ALELOS
ΔF508	23
Y1014C	4
R1162X	3
711+1G-T	2
G576A	2
L206W	2
S1235R	2
R117H	2
2183AA-G	1
V562I	1
D1152H	1
E217G	1
E588V	1
F1052V	1
F1074L	1
G542X	1
I148T	1
R1066C	1
R334W	1
V232D	1
V754M	1
Y1092X	1

-MUTACIONES IDENTIFICADAS MEDIANTE CHIPS EN EL PROGRAMA PILOTO DE CRIBADO (2006-2007).

Asimismo, siguiendo el protocolo de actuación en el cribado, se secuenciaron las muestras en las que el chip sólo había identificado una mutación. En total se secuenciaron en este período otras 59 muestras confirmándose las mutaciones previamente identificadas y hallando otras como la G1069R.

IV.1.3.2.- CASOS DIAGNOSTICADOS CON FIBROSIS QUÍSTICA MEDIANTE CHIPS EN CRIBADO

Nuestro objetivo más importante dentro del programa piloto de cribado para la fibrosis quística era el de buscar recién nacidos con dos alelos mutados, lo cual identificaría de manera temprana a un individuo afectado con la enfermedad. Durante este período se diagnosticaron de esta manera un total de 11 neonatos, cuyos genotipos se pueden ver a continuación:

AÑO	ALELO 1	ALELO 2
2006	R1162X	E588V
2006	ΔF508	L206W
2006	ΔF508	ΔF508
2006	ΔF508	ΔF508
2007	ΔF508	R117H
2007	ΔF508	L206W
2007	ΔF508	ΔF508
2007	ΔF508	ΔF508
2007	G576A	G1069R
2007	ΔF508	ΔF508
2007	ΔF508	ΔF508

-GENOTIPOS DE LOS CASOS DIAGNOSTICADOS CON FQ MEDIANTE EL PROGRAMA PILOTO DE CRIBADO (2006-2007).

IV.2.- CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LOS CHIPS-CFTR

Tras la experiencia acumulada utilizando las versiones iniciales de los chips se han podido comprobar las características diferenciales de los mismos, que hacen de esta tecnología una de las más adecuadas para su utilización en programas de cribado neonatal con unas ventajas importantes respecto a la mayoría de los métodos existentes en la actualidad para el análisis genético de CFTR.

IV.2.1.- FLEXIBILIDAD

Una de las características diferenciales más importantes de esta tecnología es su flexibilidad. Las mutaciones incluidas en las *plexes* de los chips pueden modificarse a voluntad y de esta manera se pueden ir añadiendo nuevas mutaciones para el análisis genético de CFTR en caso de ser necesario en las sucesivas versiones. Este sistema *abierto* se contrapone totalmente a la mayoría de los métodos de análisis genético comerciales, que presentan el gran inconveniente de ser sistemas *cerrados* en los que se estudian un número muy limitado de mutaciones (generalmente sobre 30-40) y que de ningún modo pueden adaptarse a las necesidades analíticas de poblaciones en las que, como veremos ocurre en la nuestra, pueda existir una frecuencia elevada de mutaciones diferentes a las que aparecen en los kits comerciales. La posibilidad de actualización de nuestro sistema se presenta, por tanto, como una de sus características más destacables.

En nuestro caso, la primera versión del chip analizaba 119 variantes. La versión siguiente, que apareció en el año 2007, aumentó su cobertura a 175 variantes. La última versión, del año 2008 (en pruebas), contiene inicialmente 184 variantes. En el anexo adjunto (Anexo III) puede verse de manera esquemática la evolución en la cobertura de análisis de los chips.

IV.2.2.- SENSIBILIDAD

La alta sensibilidad de los chips es otra característica importante de los mismos. En principio, la cantidad mínima teórica necesaria para el genotipado es de 10-20 nanogramos de ADN. Esta *pequeña* cantidad (basta 2 μ L a una concentración 10 ng/ μ L) hace que muestras mínimas sean suficientes para obtener el ADN necesario para realizar un genotipado satisfactorio. En los programas de cribado neonatal esta característica es fundamental ya que las muestras disponibles para realizarlos suelen ser escasas, generalmente manchas de sangre impregnadas en papel.

Las cantidades mínimas necesarias para el genotipado con tecnologías de genotipado semejantes suelen ser mucho mayores. Por ejemplo, el CF-*Microarray* de Asper Biotech, requiere 1,75 μ g de ADN genómico para el análisis (aproximadamente 100 veces más).

IV.2.3.- COBERTURA

La amplia cobertura de nuestro sistema es un aspecto fundamental de los Chip-CFTR. La última versión analiza ya conjuntamente más de 180 mutaciones. Este panel de genotipado incluye, como se ha citado anteriormente, a las mutaciones más frecuentes en población europea para las que existe información en la literatura científica durante los últimos años.

La mayoría de los kits comerciales existentes en la actualidad para el análisis genético de FQ adolecen de una cobertura reducida de mutaciones a estudio (Johnson MA *et al*, 2007). Esto se debe principalmente a que, tomando como referencia las recomendaciones de la ACMG/ACOG (*American College of Medical Genetics/American College of Obstetricians and Gynecologists*), la mayoría de ellos incluyen un panel a estudio de aproximadamente 30 mutaciones.

La ACMG/ACOG publicó en el año 2002 (Richards CS *et al*, 2002) unas recomendaciones para el análisis mutacional de CFTR. En dichas recomendaciones se sugería un panel de 25 mutaciones que se suponía contenía las mutaciones con una frecuencia de al menos 0,1% existentes en los diversos grupos étnicos norteamericanos. Además, recomendaba la realización de unos tests (*reflex tests*) para evitar la confusión con otros polimorfismos en el caso de que aparecieran la mutaciones $\Delta F508$ ó $\Delta I507$ en homocigosis (tests para I506V, I507V y F508C) o en caso de ser positivo para la mutación R117H (test para la politimina del intrón 8).

Posteriormente, una revisión de este panel (Watson MS *et al*, 2004) reduciría las recomendaciones de análisis a únicamente 23 mutaciones (manteniendo los *reflex test*). Este panel se consideró desde el momento de su aparición como referencia para el análisis genético de CFTR en Norteamérica y para el desarrollo de kits comerciales utilizados en otros muchos países, incluyendo países europeos.

$\Delta F508$	R347P
G542X	711+1G-T
W1282X	R334W
G551D	R560T
621+1G-T	R1162X
N1303K	3659delC
R553X	A455E
$\Delta I507$	G85E
3849+10kbC-T	2184delA
3120+1G-A	1898+1G-A
R117H	I148T
1717-1G-T	1078delT
2789+5G-A	<i>REFLEX TEST</i> : I506V, I507V, F508C, IVS8-poliT

-PANEL DE MUTACIONES RECOMENDADO POR LA ACMG/ACOG (EN NEGRITA MUTACIONES ELIMINADAS EN REVISIÓN DE 2004).

Hay que tener en cuenta que, aunque este panel pretendió inicialmente ser un panel útil para cualquier grupo étnico, se basó principalmente en frecuencias de mutaciones en Caucásicos no hispánicos y en Judíos Ashkenazi, debido a la alta frecuencia de la enfermedad y a la

disponibilidad de los datos mutacionales. De hecho este panel se consideraba que identificaba aproximadamente el 97% de las mutaciones en Judíos Ashkenazi, 90% en Caucásicos, 69% en Afroamericanos y un 57% en Americanos Hispanos.

En la población española, sin embargo, nos encontramos con una situación muy específica. Las publicaciones existentes sobre el espectro mutacional en poblaciones españolas indican una gran variedad de mutaciones. De hecho, inicialmente se describió a la población española como la de mayor heterogeneidad mutacional en CFTR de las estudiadas hasta el momento (Casals T *et al*, 1997), indicando la necesidad del estudio de al menos 75 mutaciones para caracterizar el 90% de los alelos mutados. Estudios más recientes en los que se analizaron casi 2000 alelos de pacientes españoles con FQ indican la necesidad de analizar al menos 121 mutaciones para caracterizar el 96% de los alelos mutados (Alonso MJ *et al*, 2007).

Un dato interesante al respecto se puede comprobar observando los resultados en las mutaciones que hemos identificado con nuestra metodología y los que hubiésemos obtenido utilizando únicamente el panel estándar estadounidense. A continuación se pueden observar indicadas en rojo los genotipos hallados en los casos identificados mediante cribado que hubiesen pasado inadvertidos siguiendo el panel:

ΔF508	S1235R	I148T
Y1014C	V562I	R1066C
R1162X	D1152H	R334W
2183AA-G	E217G	V232D
711+1G-T	E588V	V754M
G576A	F1052V	Y1092X
L206W	F1074L	G1069R
R117H	G542X	

Como se puede ver, de las 23 mutaciones diferentes identificadas en los distintos casos durante el programa piloto de cribado, únicamente 7 (30%) formaban parte del panel estadounidense recomendado.

Otro dato a destacar sería el de los casos identificados con FQ mediante nuestro sistema de análisis que hubiesen pasado inadvertidos siguiendo las recomendaciones norteamericanas. En la siguiente tabla se pueden ver los genotipos de los casos identificados con FQ utilizando Chips-CFTR, señalando en negrita los genotipos no incluidos en el panel:

ALELO 1	ALELO 2
R1162X	E588V
ΔF508	L206W
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508
ΔF508	R117H
ΔF508	L206W
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508
G576A	G1069R
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508

Como se puede ver, de los 11 casos identificados durante el programa piloto de cribado (en los que se encontraron 2 alelos mutados) 3 de ellos habrían pasado como portadores y, lo que resulta más alarmante,

Este test, basado en el principio de hibridación reversa (*reverse dot-blot*), utiliza unas tiras de nitrocelulosa con las que se logra analizar simultáneamente 36 mutaciones. El precio aproximado en febrero de 2008 (PVP) de los reactivos necesarios para la realización de 20 tests era de 2500 euros (125 euros/muestra). Habría que tener en cuenta que, además de los reactivos, es necesaria la compra/*leasing* de un dispositivo necesario para llevar a cabo las reacciones y del escáner para la lectura automática de las tiras. Por otro lado también habría que considerar el tiempo del personal que lo lleva a cabo técnicamente.

Comparativamente, el gasto en un análisis con la última versión del chip que contiene más de 170 mutaciones (incluidas todas las del INNO-LiPA) se aproxima a los 105 euros.

Por tanto, como se puede observar, nos encontramos con un método que no sólo aporta mayor cobertura en el análisis y se adapta mejor a nuestra población sino que su coste incluso es inferior al de otros métodos comerciales tradicionalmente utilizados.

IV.2.5.- RAPIDEZ

Una característica importante de las pruebas genéticas para diagnóstico clínico es el tiempo necesario para su realización. El genotipado mediante chips posee también la ventaja de la rapidez. Así, el tiempo aproximado total para realizar todos los pasos necesarios para el genotipado es de 8 horas, dividido en las siguientes etapas:

- 1) PCR: 2 horas 30 minutos.
- 2) SAP: 40 minutos.
- 3) Reacción de extensión: 3 horas 30 minutos.
- 4) Purificación con resinas: 20 minutos.
- 5) Punteado de muestra en chip y lectura: 1 hora.

Este tiempo para el análisis resulta muy corto si se compara con otros métodos que aportan una cobertura semejante, como podría ser el caso de la secuenciación directa. La secuenciación de las 14 muestras que se pueden analizar simultáneamente en un mismo chip podría prolongarse durante semanas, sin tener en cuenta la complejidad de procesos para realizarla. Con nuestra metodología, de ser necesario, podrían obtenerse los resultados de los genotipos en un solo día.

IV.2.6.- EXACTITUD

La gran exactitud de la espectrometría de masas MALDI-TOF en el campo del genotipado es un hecho constatado (Sun X *et al*, 2006; Sauer S, 2006) y ha sido una de las causas del interés creciente de su aplicación en el campo de la genética con unos niveles de exactitud descritos superiores al 99.7%.

En nuestro caso, la exactitud de nuestros chips viene avalada, además, de dos maneras: mediante la realización de programas de controles de calidad y mediante la secuenciación.

IV.2.6.1.- CONTROLES DE CALIDAD

En nuestro laboratorio, a la vez que desarrollamos los chips para el análisis genético de CFTR, llevamos a cabo controles de calidad externos que certifican su validez.

En concreto, todos los años llevamos a cabo dos tipos de controles de calidad, el control de calidad europeo de la *Cystic Fibrosis European Network (External European Quality Assessment)* y el control de calidad norteamericano del *Center for Disease Control and Prevention (Newborn Screening Quality Assurance Program)*.

1.- CYSTIC FIBROSIS EUROPEAN NETWORK: CF EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT.

La finalidad de este control es la evaluación del proceso analítico de una manera global, desde la recepción de muestras de ADN y el genotipado hasta el informe escrito con la interpretación final de los datos.

Tres muestras con ADN purificado con mutaciones en CFTR se reciben en el laboratorio y generalmente se tiene un margen próximo a las 8 semanas para analizarlas y enviar los resultados *online* junto a la interpretación de los mismos.

Asimismo los participantes tenemos que informar acerca de la metodología que utilizamos para el análisis genético, de las mutaciones que estudiamos y de los genotipos obtenidos conjuntamente con un informe escrito. Los organizadores (www.cftnetwork.be) los evalúan y preparan informes individuales que nos envían a los participantes sobre nuestros resultados, recibiendo un certificado de participación.

En este control de calidad se nos presentan casos en los que se da información de los antecedentes familiares y se hacen preguntas para las que en ocasiones es necesario el cálculo de riesgos relativos u otros datos de frecuencias.

2.- CDC: NEWBORN SCREENING QUALITY ASSURANCE PROGRAM-CYSTIC FIBROSIS PROFICIENCY TESTING.

Este programa es un programa voluntario creado por el CDC para mantener y mejorar la calidad de los tests genéticos.

El *Proficiency Testing* proporciona especímenes codificados a los laboratorios participantes cada cuatrimestre para comprobar si llegamos a un resultado adecuado. En caso de no dar los resultados adecuados se ponen en contacto para identificar y solucionar el problema.

En este control los resultados se limitan al genotipo y a indicar si es *wild-type*, portador o positivo (2 mutaciones) para fibrosis quística. El informe que se remite tiene el siguiente formato:

**PERFORMANCE EVALUATION - CYSTIC FIBROSIS MUTATION DETECTION
PILOT PROGRAM---DATA REPORT FORM**

Performance Evaluation Materials Set: Quarter 1 Distribution Date: 2008

LABORATORY CODE NUMBER: 670

Method code number: 1.9 if other indicated, please specify MSLDI-TOF

LABORATORY RESULTS	Observed Genotype Example: ΔF508/ G551D or p.F508del / p.G551D	CF Clinical Assessment Enter code for each specimen
Specimen Number 18C1	ΔF508 / ΔF508	2
Specimen Number 18C2	621+1G-T / R1162X	2
Specimen Number 18C3	ΔF508 / R560T	2
Specimen Number 18C4	ΔF508 / WT	1
Specimen Number 18C5	ΔF508 / WT	1

Comments:

LAB. METABOLOPATÍAS
F.P. MED. XENOTECNA

Laboratory _____ Contact Person: _____

Phone Number: +34981951490 Fax Number: +34981951473

Email: _____

Email data to mearley@cdc.gov or fax to 770-488-7459; for verification of receipt, please contact Marie Earley at (770) 488-7828 or email at mearley@cdc.gov.

-EJEMPLO DE INFORME RELLENADO PARA CONTROL DE CALIDAD.

Concretamente, dentro de este control de calidad participamos en dos tipos de programas: El *Cystic fibrosis (IRT/DNA)* y el de *Cystic Fibrosis Mutation Detection*. En el primero de ellos sólo realizamos el análisis del ADN de muestras provenientes en manchas de sangre. En el segundo, realizado en conjunto con la Unidad de Metabolopatías, se realiza previamente un análisis de los niveles de TIR (Auto-Delfia) y analizamos posteriormente los que tienen niveles elevados.

Cabe destacar que somos el único laboratorio que participa en estos controles de calidad con una tecnología de genotipado mediante espectrometría de masas.

IV.2.6.2.- COMPROBACIÓN POR SECUENCIACIÓN

Todos los resultados obtenidos mediante MALDI-TOF han sido confirmados mediante la secuenciación directa del exón correspondiente. Hasta la fecha todos las muestras secuenciadas han mostrado coincidencia con los genotipos previamente realizados mediante espectrometría, lo cual confirma la gran exactitud del método.

Por otro lado, hasta la fecha no han aparecidos falsos negativos en el programa piloto de cribado lo cual respalda una vez más la calidad de nuestro método de análisis genético.

IV.2.7.- PROBLEMAS EN LOS GENOTIPADOS

Aunque desde el comienzo de la utilización de los Chips-CFTR esta tecnología ofreció pocas dificultades para de su desarrollo, hay que indicar que sí existieron algunos problemas en este proceso, los más importantes de los cuales citaré a continuación.

- GENOTIPOS NO INTRODUCIBLES EN ENSAYOS:

Pese a que actualmente hemos conseguido desarrollar un chip con una amplia cobertura, cabe destacar el hecho de que ciertas mutaciones no pudieron ser introducidas en ensayos *multiplex*.

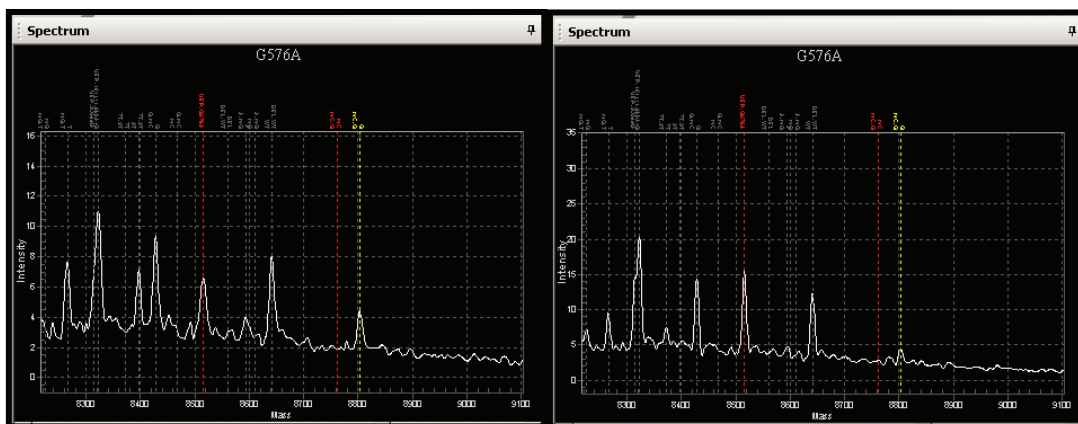
Esto hecho pudo ser debido a interacciones entre los *primers* que impidieron que el programa informático de diseño de ensayos insertara de manera repetida (incluso cambiando las condiciones) a la mutación en ensayos *multiplex* dejándolos únicamente en *plexes* de un solo genotipo, lo cual incrementaría mucho el coste del chip disminuyendo notablemente su coste-efectividad (en esta situación la mutación era descartada del diseño).

- ESPECTROS PROBLEMÁTICOS:

Aunque en la mayoría de los espectros obtenemos picos con una elevada intensidad, lo cual nos permite asignar los genotipos con claridad, en ocasiones nos encontramos también con casos de espectros problemáticos por diversos motivos:

A) ESPECTROS DE SEÑAL VARIABLE

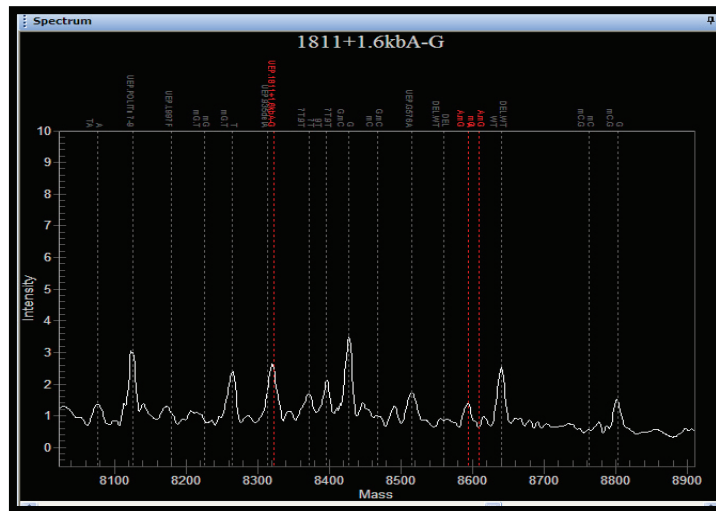
En algunos casos nos encontramos con espectros en los que varía la intensidad según la prueba. Así sucedió por ejemplo con la mutación G576A del Chip-CFTRv2006, que en ocasiones mostraba picos con intensidad alta y en otros bajaba notablemente, sin conocerse el motivo exacto de estas variaciones en los espectros (probablemente por encontrarse en el tramo final del espectro generado en su ensayo).



-ESPECTROS PARA LA MUTACIÓN G576A.

B) ESPECTROS CON SEÑAL BAJA

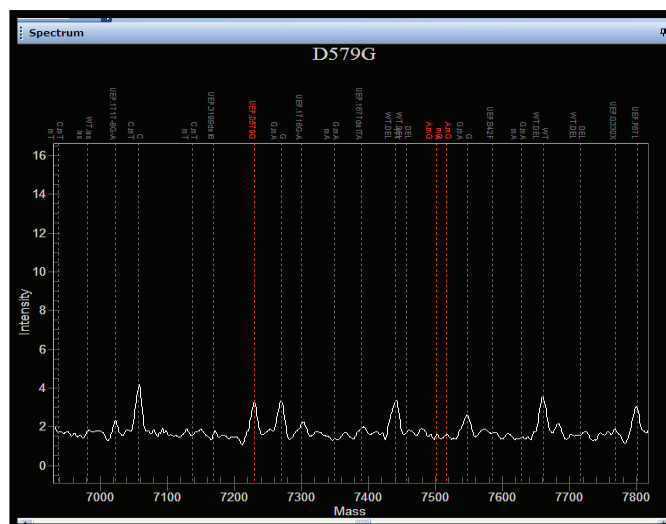
En otros casos, mutaciones como la 1811+1.6kbA-G, daban lugar a espectros de intensidad baja, lo cual provocaba que el programa informático no asignara automáticamente los genotipos, teniendo que asignarse manualmente uno a uno, con la consecuentes molestias y enlentecimiento del proceso.



-ESPECTRO PARA LA MUTACIÓN 1811+1.6kbA-G.

C) ESPECTROS SIN SEÑAL

Por último, en casos como el de la mutación D579G, nos encontramos con que aunque el programa informático había insertado inicialmente a la mutación en un ensayo (suponiendo por tanto que el espectro iba a ser adecuado) en realidad no se producía extensión de la muestra (no había pico de extensión). Este hecho podría deberse a problemas en la amplificación no estimados correctamente por el programa informático de diseño de *primers*.



-ESPECTRO PARA LA MUTACIÓN D579G.

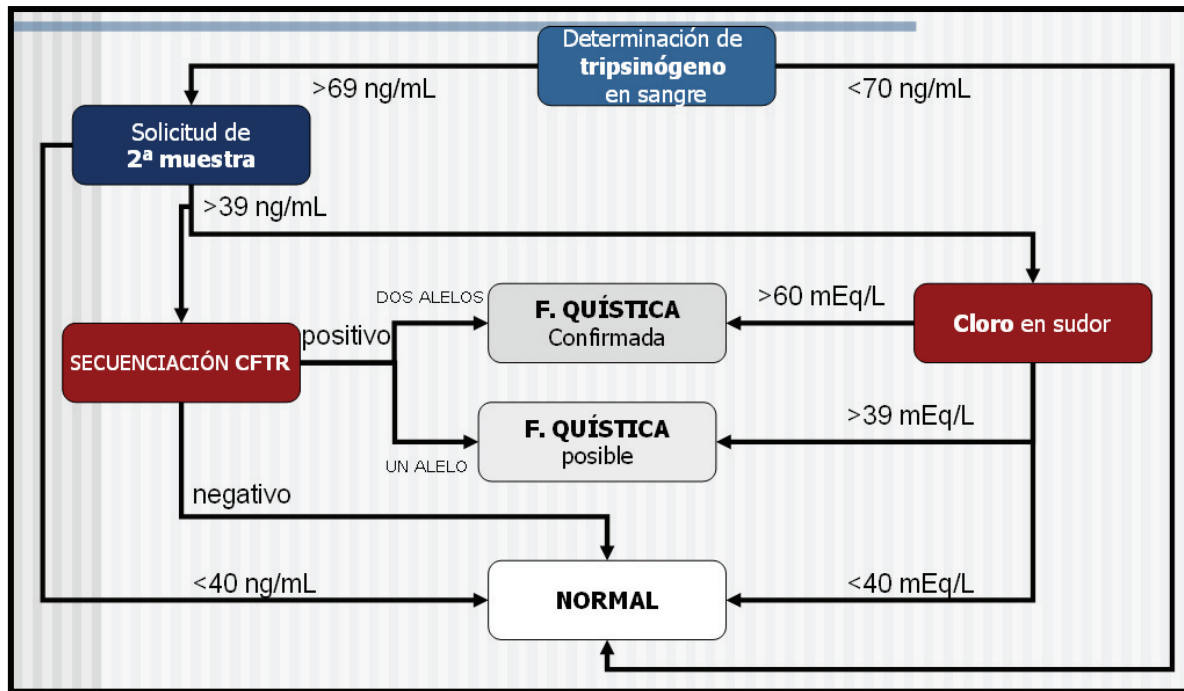
Todas estas mutaciones problemáticas fueron incluidas en nuevos ensayos en las versiones 2007 y 2008 de los chips para paliar estos inconvenientes.

IV.3.- ADECUACIÓN DE NUEVAS TECNOLOGÍAS A PROGRAMAS DE CRIBADO

IV.3.1.- ORIGEN DE LOS CHIPS Y PROTOCOLOS DE CRIBADO

No hay que olvidar que el nacimiento de los chips surge motivado por el interés en desarrollar un nuevo método de análisis genético para un problema clínico cuyos orígenes deben buscarse en el año 2003. Por entonces se iniciaba un programa piloto de cribado neonatal de FQ en Galicia en el que se había decidido introducir la información genética. El interés por la información genética dentro de este cribado vino sugerido desde la Unidad de Metabolopatías de nuestro Hospital, en la que habían utilizado los niveles de TIR como marcador bioquímico de FQ, obteniendo resultados no satisfactorios debido a una elevada tasa de repetición y de falsos-positivos.

Por entonces ponemos a punto la metodología necesaria para la secuenciación de la región codificante del gen, utilizándose hasta el año 2005 dentro de un algoritmo de actuación que se puede ver en el diagrama siguiente:



-ESQUEMA DEL PROTOCOLO DE CRIBADO INICIAL PARA FQ.

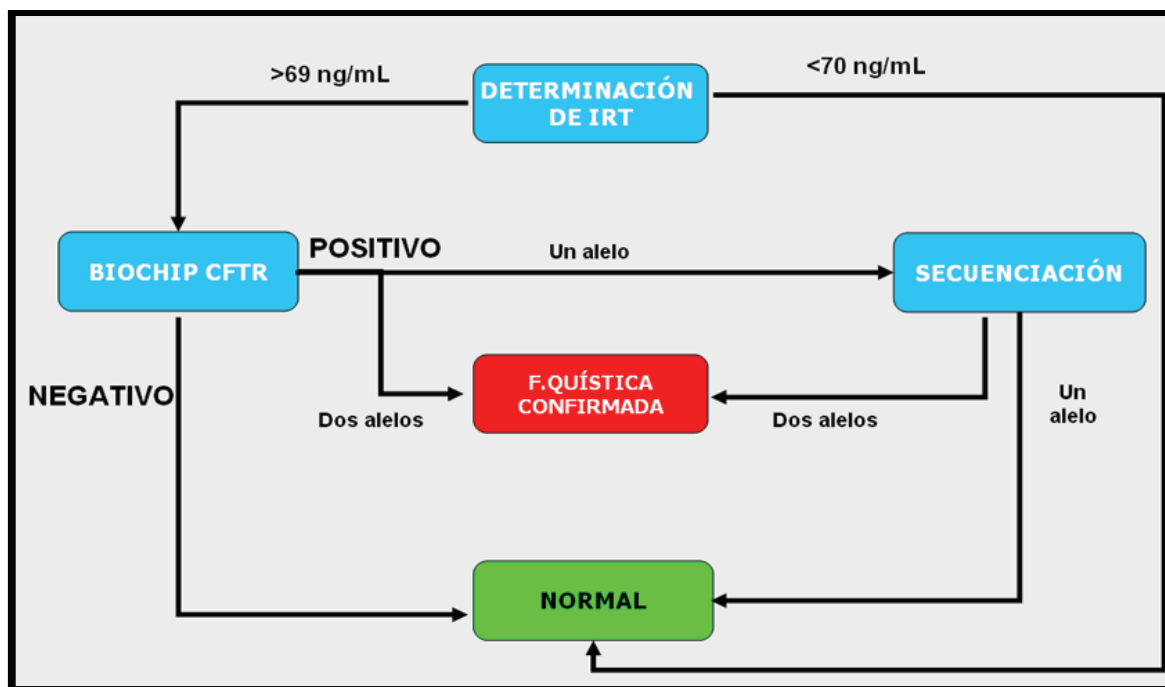
En este modelo de cribado se comenzaba con la medida de niveles de TIR de una muestra de mancha de sangre. En el caso de ser superior a 70 ng/mL se procedía pedir una segunda muestra, también en papel, con la que se volvía a realizar una nueva medida de TIR (generalmente se reclamaba la muestra si no llegaba antes de un mes desde la fecha de nacimiento). En caso de ser superior esta segunda medida a 40 ng/mL se procedía a citar a la familia para obtener una muestra de sangre líquida y poder realizar el análisis genético mediante secuenciación directa. Al mismo tiempo se realizaba la medida de cloruro en sudor, la anamnesis y el estudio familiar.

Aún teniendo en cuenta las múltiples ventajas que ofrecía la secuenciación del gen CFTR frente a otros métodos de análisis genético comerciales probados en el laboratorio para la FQ (como el INNO-LiPA-CFTR), no dejaba de ser un método laborioso en el que había numerosas etapas (como puede comprobarse en el capítulo de metodología) y en el que podían transcurrir varias semanas antes de poder dar una información completa útil para los profesionales médicos debido al gran número de muestras que se acumulaban para secuenciar. La larga incertidumbre de los padres antes de recibir la posible confirmación de un diagnóstico de FQ se

presentaba como el problema crítico a resolver para la optimización del programa de cribado.

Teniendo esto en cuenta y observando los avances que se sucedían año tras año en las distintas tecnologías de genotipado (Meng Z *et al*, 2004) decidimos crear el Chip-CFTR como un posible método óptimo para un programa de cribado.

La introducción de esta nueva tecnología para el análisis genético de CFTR dio lugar cambios importantes en el protocolo de cribado, cuyo esquema actual se puede ver en la imagen inferior:



-PROTOCOLO DE CRIBADO ACTUAL PARA FIBROSIS QUÍSTICA.

El cambio de esquema en el protocolo trajo consigo dos repercusiones importantes que hicieron que esta tecnología diagnóstica se adecuara mucho mejor al proceso de cribado:

En primer lugar se eliminó la segunda medida de TIR. Con esta nueva tecnología era suficiente con un pequeño fragmento de una mancha de sangre procedente del cartón para el estudio de metabopatías de todos los recién nacidos gallegos (no se necesitaba pedir una nueva muestra a los

padres para secuenciar) con lo cual se evitaba el estrés de unos padres pendientes de saber si su hijo recién nacido padecería FQ.

En segundo lugar, en el plazo máximo de un mes todos los individuos analizados tienen sus resultados. Este plazo se *consensuó* con la Unidad de Metabolopatías teniendo en cuenta plazos oficiales para realizar un programa de cribado y el número de muestras necesarias para que el análisis fuera coste-efectivo (utilizar un chip para analizar una sola muestra no sería viable).

En este esquema se simplifica y se elimina la medida del cloruro en sudor, que sigue utilizándose en el seguimiento clínico a voluntad del facultativo en caso de encontrar dos alelos mutados. Cabe destacar que dentro de este protocolo no se informa a los individuos portadores.

IV.3.2.- RESULTADOS DE CRIBADO PREVIOS AL USO DE CHIPS

Durante el período inicial de cribado 2003-2005 se analizaron un total de 223 muestras. Las mutaciones encontradas en estos años mediante el método de secuenciación directa de la región exónica del gen CFTR fueron las siguientes:

MUTACIÓN	Nº DE ALELOS
ΔF508	11
V232D	2
F1052V	2
2184insA	2
I148T	2
L206W	2

R334W	2
G576A	2
P205S	1
2176insC	1
711+1G-T	1
D1270N	1
M952I	1
R1162X	1
R74W	1
S1235R	1
S42F	1
Y1014C	1
R117H	1
D1152H	1

-MUTACIONES ENCONTRADAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN DIRECTA EN EL PROGRAMA PILOTO DE CRIBADO (2003-2005).

Además de estas mutaciones, desde un punto de vista poblacional cabe destacar el hallazgo de polimorfismos frecuentes en ciertos exones de las muestras analizadas. Concretamente, los exones en los que aparecieron de SNPs con frecuencia fueron:

1. Exón 10: rs213950, rs1800094, rs1800095.
2. Exón 14A: rs1042077.
3. Exón 24: rs1800136.

Otros SNPs no sinónimos fueron R75Q, T351S, F508C o R668C.

Los genotipos de los casos identificados con FQ durante este período de cribado pueden verse en la siguiente tabla:

AÑO	ALELO 1	ALELO 2
2003	ΔF508	2184insA
2003	2184insA	G576A
2004	ΔF508	R334W
2004	ΔF508	R1162X
2005	ΔF508	D1152H
2005	ΔF508	2176insC
2005	711+1G-T	V232D

-GENOTIPOS DE LOS CASOS DIAGNOSTICADOS CON FQ MEDIANTE EL PROGRAMA PILOTO DE CRIBADO (2003-2005).

IV.3.3.- RESULTADOS GLOBALES DE CRIBADO EN PERÍODO 2003-2007

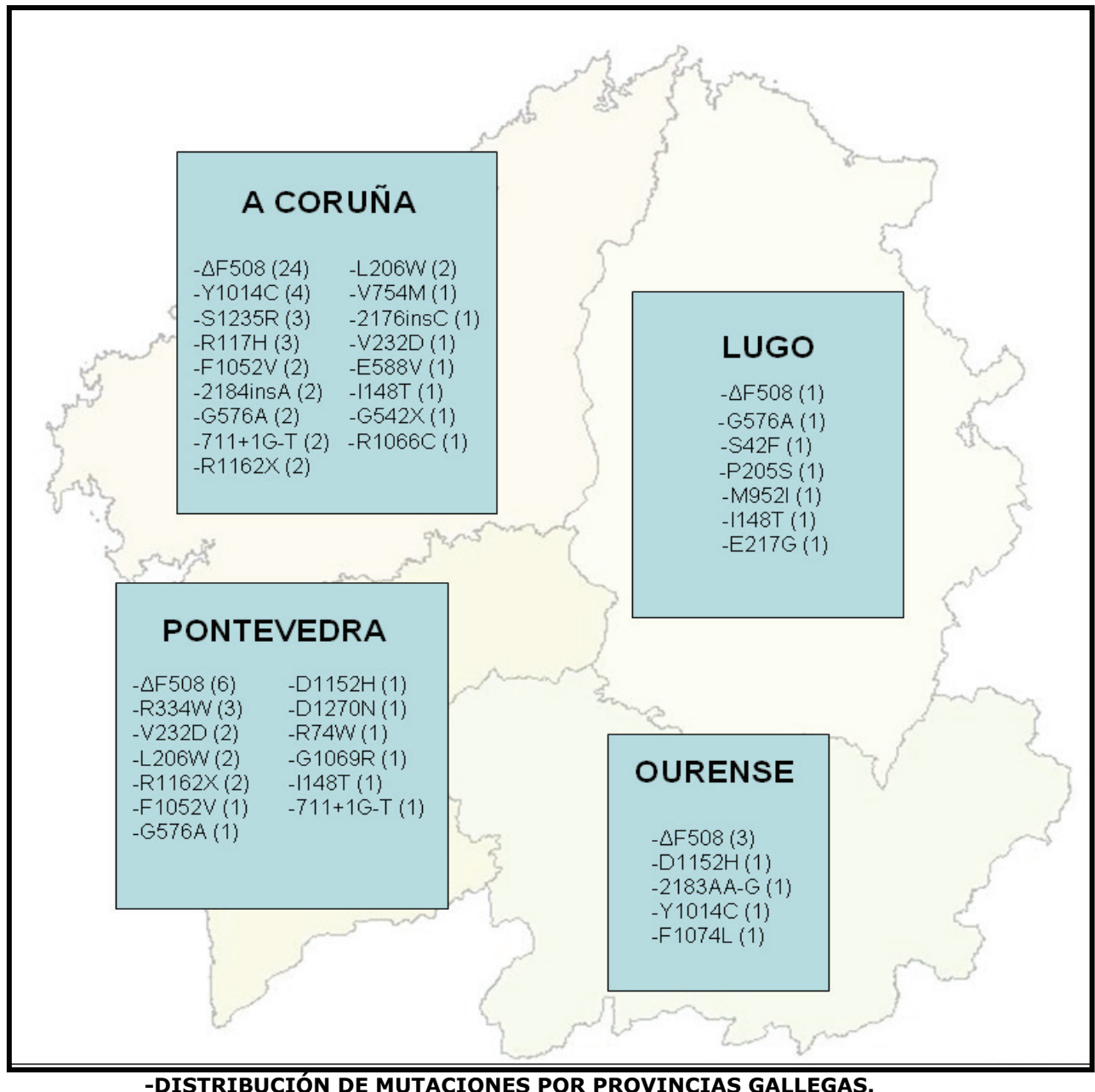
Teniendo en cuenta los resultados del cribado obtenidos mediante secuenciación conjuntamente con los de la utilización de chips, durante el período 2003-2007 hemos encontrado las siguientes mutaciones en los neonatos con los niveles de TIR elevados:

MUTACIÓN	Nº DE ALELOS
ΔF508	34
Y1014C	5
L206W	4
R1162X	4
G576A	4
711+1G-T	3
F1052V	3
I148T	3

R334W	3
S1235R	3
V232D	3
R117H	3
2184insA	2
D1152H	2
2176insC	1
2183AA-G	1
D1270N	1
E217G	1
E588V	1
F1074L	1
G1069R	1
G542X	1
M952I	1
P205S	1
R1066C	1
R74W	1
S42F	1
V562I	1
V754M	1
Y1092X	1

-MUTACIONES ENCONTRADAS GLOBALMENTE DURANTE EL PROGRAMA PILOTO DE CRIBADO (2003-2007).

Como se puede ver, en total se identificaron 30 mutaciones diferentes siendo la más frecuente, como cabría esperar, la $\Delta F508$. Respecto a la distribución poblacional de las mutaciones encontradas (véase gráfica siguiente) en A Coruña y Pontevedra encontramos un mayor número de mutaciones lo cual resulta lógico al ser las provincias gallegas en las que se registran más nacimientos.



Los datos procedentes del programa piloto de cribado neonatal para la FQ durante estos años pueden verse resumidos en la siguiente tabla:

	2003	2004	2005	2006	2007	TOTAL	FRECUENCIA
NIÑOS ANALIZADOS	19.911	20.548	21.165	21.270	22.143	105.037	
TIR ELEVADO 1ª MUESTRA	139	154	164	137	203	797	0.76%
TIR ELEVADO 2ª MUESTRA	-	28	57	-	-	85	0.20%
ESTUDIO GENÉTICO	138	28	57	137	203	563	0.54%
PORTADORES	13	3	6	10	21	53	1:1981
FIBROSIS QUÍSTICA	2	2	3	4	7	18	1:5835

-DATOS DEL PROGRAMA PILOTO DE CRIBADO NEONATAL (2003-2007).

El número elevado de pacientes para estudio genético en 2003 se debe a que en ese año todavía no se hacía una segunda medida de los niveles de TIR. En 2004 y 2005 para optimizar el proceso de secuenciación se inicia el protocolo con doble TIR, con el cual se siguió detectando el mismo número de pacientes. A partir del años 2006 se usan los chips con lo cual se vuelve a eliminar la segunda medida de TIR.

Como se puede observar, la prevalencia al nacimiento en nuestra comunidad se aproxima a 1 de cada 6000 nacidos. Comparando este dato con el de otros programas de cribado existentes en España vemos que nuestra prevalencia es muy semejante aunque ligeramente inferior: Castilla y León 1/4083, Cataluña 1/5457 y Baleares 1/4433.

Otra cuestión importante se desprende de los datos recogidos en la siguiente tabla:

	FECHA INICIO OFICIAL	TOTAL DESDE INICIO	FRECUENCIA NORMALIZADA
LEUCINOSIS	1978	18	1/30.700
FENILCETONURIA	1978	40	1/13.815
HIPERFENILALANINEMIA	1978	55	1/10.047
HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO	1980	226	1/2.414
DÉFICIT ACIL-COA- DESHIDROGENASA CADENA MEDIA (MCAD)	2000	7	1/21.801
FIBROSIS QUÍSTICA		18	1/5.835

-DATOS DE ENFERMEDADES INCLUÍDAS OFICIALMENTE EN EL PROGRAMA GALEGO PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE ENFERMEDADES ENDÓCRINAS E METABÓLICAS EN PERÍODO NEONATAL.

Comparando la prevalencia al nacimiento de la FQ con la de algunas aminoacidopatías que se analizan en el programa gallego de cribado (leucinosis, fenilcetonuria, hiperfenilalaninemia) se ve que es de 3 a 5 veces superior. Tan sólo el hipotiroidismo congénito, de las patologías consideradas graves, tiene una mayor prevalencia al nacimiento. Por otro lado, comparándola con patologías de implantación reciente como los defectos de la β -oxidación de los ácidos grasos, la FQ también muestra una prevalencia muy superior.

Debido al éxito obtenido en este período piloto, actualmente el cribado para la FQ se encuentra pendiente de su instauración oficial en Galicia. A nivel estatal, se encuentra en debate entre las sociedades científicas implicadas en el cribado neonatal en España y el Ministerio de Sanidad la unificación de un mínimo de patologías para ser detectadas en todos los centros de cribado neonatal regionales (entre las que se baraja la posibilidad de incluir a la FQ).

IV.3.3.1.- DESCRIPCIÓN DE CASOS DIAGNOSTICADOS CON FIBROSIS QUÍSTICA MEDIANTE EL PROGRAMA PILOTO DE CRIBADO

A continuación se muestra una tabla resumen con los genotipos de los casos identificados con FQ mediante el programa piloto de cribado desde su comienzo en el año 2003:

CASO	AÑO	ALELO 1	ALELO 2
1	2003	ΔF508	2184insA
2	2003	2184insA	G576A
3	2004	ΔF508	R334W
4	2004	ΔF508	R1162X
5	2005	ΔF508	D1152H
6	2005	ΔF508	2176insC
7	2005	711+1G-T	V232D
8	2006	R1162X	E588V
9	2006	ΔF508	L206W
10	2006	ΔF508	ΔF508
11	2006	ΔF508	ΔF508
12	2007	ΔF508	R117H
13	2007	ΔF508	L206W
14	2007	ΔF508	ΔF508
15	2007	ΔF508	ΔF508
16	2007	G576A	G1069R
17	2007	ΔF508	ΔF508
18	2007	ΔF508	ΔF508

-GENOTIPOS DE LOS CASOS DIAGNOSTICADOS CON FQ MEDIANTE EL PROGRAMA PILOTO DE CRIBADO (2003-2007).

Cabe destacar que el criterio seguido para seleccionar los casos con FQ ha sido el de encontrar en el recién nacido dos mutaciones asociadas previamente a fenotipos más o menos graves de la enfermedad.

Como se puede observar, la frecuencia de la mutación $\Delta F508$ en los casos diagnosticados con FQ mediante el programa de cribado es de 55,55% (20 alelos de 36 totales), muy semejante a la descrita por los escasos estudios existentes sobre población española de 53,2% (Casals T *et al*, 1997) y 51,74% (Alonso MJ *et al*, 2007).

Es destacable el caso de dos ayuntamientos en los que se ha encontrado una elevada prevalencia al nacimiento:

NACIMIENTOS EN AYUNTAMIENTO	CASOS FQ (2003-2007)	PREVALENCIA AL NACIMIENTO
1.587	4	1/397
326	2	1/163

De los 18 casos de FQ detectados en Galicia, 6 son de estos ayuntamientos. Comprobaremos en los próximos años si se ha debido a un artefacto estadístico o si, al contrario, se mantienen estas elevadas prevalencias que de ser ciertas probablemente llevarían a realizar algún tipo de medida *preventiva*.

A continuación trataré de profundizar en cada uno de estos casos, tanto en la relación genotipo-fenotipo como en los datos clínicos que he logrado recopilar. Respecto a la mutación $\Delta F508$, mutación asociada a fenotipos graves a nivel pulmonar y pancreático, no haré comentarios y me centraré en las relaciones genotipo-fenotipo descritas para el resto de mutaciones teniendo en cuenta los datos de la *Cystic Fibrosis Mutation Database*.

CASO 1: Δ F508 / 2184insA

En este caso encontramos las mutaciones Δ F508 y 2184insA en heterocigosis. Esta inserción de una alanina en el nucleótido 2184 había sido anteriormente descrita en un paciente de 19 años que mostraba insuficiencia pancreática y problemas pulmonares severos. Nos encontramos pues ante un genotipo con posibles repercusiones graves para el paciente.

Respecto a los datos clínicos, ha tenido una evolución clínica favorable. Ha pasado por controles analíticos (cloruro en sudor 105mEq/L) y ecográficos diversos que evidencian su evolución favorable. Asimismo recibe suplementación nutricional y enzimática.

CASO 2: 2184insA / G576A

En este caso encontramos las mutaciones 2184insA y G576A en heterocigosis. Esta última mutación se encuentra descrita como una mutación con repercusiones suaves, existente en pacientes con CBAVD y con bronquiectasias diseminadas.

Respecto a los datos clínicos, hasta el momento no ha presentado sintomatología, presentándose como un niño normal con suficiencia pancreática que está sometido a controles periódicos.

CASO 3: Δ F508 / R334W

En este caso encontramos las mutaciones Δ F508 y R334W en heterocigosis. Este genotipo ya había sido descrito en pacientes españoles y se relacionaba con fenotipos suaves (suficiencia pancreática, CBAVD).

Respecto a los datos clínicos, ha pasado por controles radiográficos de tórax y senos paranasales que no evidencian alteraciones parenquimatosas pulmonares, así como ecográficos que no evidencian alteraciones a nivel abdominal. Controles analíticos mostraron un nivel de cloruro en sudor de 77 mEq/L. Respecto a los análisis microbiológicos tanto los hemocultivos como los análisis de heces fueron normales.

CASO 4: ΔF508 / R1162X

En este caso encontramos las mutaciones ΔF508 y R1162X en heterocigosis. Esta última mutación *sin sentido* ha sido ampliamente estudiada (de hecho se encontró en aproximadamente el 20% de los alelos no ΔF508 en el Noreste de Italia). Como esta mutación da lugar a una interrupción en la síntesis de la proteína CFTR, se esperaba que provocara un curso clínico severo. De nueve pacientes homocigotos estudiados se encontró que todos padecían IP mientras que el curso de la enfermedad pulmonar era de suave a moderada por lo que se supuso que la proteína a la que daba lugar podría funcionar de manera parcial en los tejidos pulmonares. Asimismo, además de asociada a IP, se encontró asociada a un mayor riesgo de colonización por *Pseudomonas*.

Respecto a los datos clínicos, el paciente ha mostrado problemas desde el momento del nacimiento. Nació con prematuridad (35 semanas) volviendo a ingresar a los 2 meses por estancamiento ponderal siendo diagnosticado en ese momento de bronquiolitis, hiperreactividad bronquial y anemia hemolítica autoinmune. A los 4 meses del nacimiento volvió a ingresar y se le diagnosticó neumonía neumocócica por *Streptococcus pneumoniae*. En una ecografía de abdomen completo mostró ecogenicidad aumentada en el hígado. En el último informe, del año 2007, se indica que no hay evidencias de patología pleuropulmonar aguda ni aparentes complicaciones en el proceso pulmonar.

CASO 5 : Δ F508 / D1152H

En este caso encontramos las mutaciones Δ F508 y D1152H en heterocigosis. La mutación D1152H fue descrita inicialmente como una mutación asociada a problemas leves pero recientemente se ha demostrado que los pacientes con esta mutación (junto a la Δ F508) poseen una amplia variedad fenotípica, pudiendo incluso padecer problemas pulmonares severos y pancreatitis (Blau H *et al*, 2006).

Respecto a los datos clínicos, hasta la fecha ha tenido una buena evolución, únicamente mostrando ingresos por infecciones en las vías aéreas superiores. Las pruebas analíticas de sangre y orina muestran parámetros normales. El cloruro en sudor también aparece normal, con 26 mEq/L.

CASO 6: Δ F508 / 2176insC

En este caso encontramos las mutaciones Δ F508 y 2176insC en heterocigosis. Esta inserción había sido descrita inicialmente en un paciente Búlgaro con otra mutación no conocida, que mostraba IP y enfermedad pulmonar grave con colonización por *P.aeruginosa* y *S.aureus*.

Respecto a los datos clínicos, en los análisis rutinarios mostró un nivel de cloruro en sudor de 98 mEq/L y el examen de grasas en heces fue positivo. A los dos meses de nacimiento ingresó mostrando unos edemas palpebrales ante la sospecha de hipoproteinemia. Actualmente recibe suplementación enzimática y nutricional.

CASO 7: 711+1G-T / V232D

En este caso encontramos las mutaciones 711+1G-T y V232D en heterocigosis. La mutación 711+1G-T se ha encontrado en varios pacientes

con IP y síntomas pulmonares suaves. La mutación V232D también se corresponde con una mutación asociada a IP y síntomas pulmonares suaves, así como CBAVD.

Respecto a los datos clínicos, a los 3 meses fue ingresado con tos y moco. El cultivo de esputo evidenció infección con *S.aureus* por lo cual se sometió a antibioterapia. En las pruebas radiológicas se encontró consolidación del lóbulo superior derecho sin pérdida de volumen. Otras pruebas analíticas mostraron unos niveles de cloruro en sudor de 63mEq/L. En una consulta a los dos años muestra una evolución clínica favorable con hábito intestinal y apetito excelente no describiéndose patología pulmonar.

CASO 8: R1162X / E588V

En este caso encontramos las mutaciones R1162X y E588V en heterocigosis. Esta última mutación fue identificada inicialmente en un paciente español de 26 años afectado con CBAVD y broquiectasias (con la mutación $\Delta F508$ en el otro alelo). Parece por tanto que no se trata de una mutación de afectación severa.

Respecto a los datos clínicos es destacable el hecho de que también nació de manera prematura (5 meses y medio), como el otro paciente con la mutación R1162X. Tras el nacimiento, clínicamente se mostró asintomático con buen apetito. En pruebas analíticas mostró un nivel de cloruro en sudor de 72 mEq/L.

CASO 9: $\Delta F508$ / L206W

En este caso encontramos las mutaciones $\Delta F508$ y L206W en heterocigosis. Este genotipo ha sido hallado en numerosos pacientes que muestran unas características comunes de suficiencia pancreática, enfermedad pulmonar leve y CBAVD.

Respecto a los datos clínicos, el paciente ingresó por presentar una importante desnutrición con afectación pondoestatural (por debajo del percentil 10), hipoproteinemia y acrodermatitis atópicas. Presentaba vómitos frecuentes y edemas palpebrales (posible pérdida iónica). Asimismo presentaba una ligera distensión abdominal y una ligera anemia. Su nivel de cloruro en sudor era 111 mEq/L.

CASO 10: $\Delta F508$ / $\Delta F508$

En este caso encontramos la mutación $\Delta F508$ en homocigosis lo cual le confiere inicialmente un mal pronóstico al paciente.

Respecto a los datos clínicos, el paciente hasta el momento ha mostrado insuficiencia pancreática y problemas pulmonares (hiperinsuflación pulmonar en radiografía de tórax). El paciente recibe con carácter permanente tratamiento (broncodilatación, fisioterapia, nebulización de mucolíticos, antibióticos) así como suplementación nutricional.

CASO 11: $\Delta F508$ / $\Delta F508$

En este caso volvemos a encontrar la mutación $\Delta F508$ en homocigosis.

Respecto a los datos clínicos, el paciente nació a término y desde entonces mostró desnutrición posiblemente relacionada con una malabsorción. Los padres fueron informados de la trascendencia del diagnóstico y se le programaron consultas multidisciplinarias. Presentó edemas palpebrales. Su nivel de cloruro en sudor fue de 101 mEq/L.

CASO 12: Δ F508 / R117H (IVS8 Tn 7/9)

En este caso encontramos las mutaciones Δ F508 y R117H en heterocigosis. Además la politimina del intrón 8 tiene el genotipo 7/9. Este genotipo se ha asociado a una FQ con síntomas pulmonares leves y CBAVD.

Respecto a los datos clínicos, existían antecedentes familiares de asma (aunque nunca con diagnóstico de FQ). El estatus al nacimiento fue normal, mostrando un nivel de cloruro en sudor de 33 mEq/L. Actualmente recibe un seguimiento con atención a los procesos catarrales y con profilaxis antibiótica. Su evolución pondoestatural ha sido normal aunque en el último control (año y medio) se evidenció un estancamiento ponderal.

CASO 13: Δ F508 / L206W

Al igual que el caso 9, nos encontramos con otro caso heterocigoto para las mutaciones Δ F508 y L206W.

Respecto a los datos clínicos, hasta el momento también se ha mostrado como totalmente asintomático, con un crecimiento pondoestatural normal y suficiencia pancreática. El nivel de cloruro en sudor es de 70 mEq/L y pasa por los controles anuales rutinarios.

CASO 14: Δ F508 / Δ F508

Este caso, homocigoto para la mutación Δ F508, presentaba a los 8 meses de edad un excelente estado general, siendo clínicamente asintomático, mostrando buen apetito y recibiendo suplementación enzimática y nutricional. Asimismo se tomaron medidas preventivas infecciosas.

CASO 15: Δ F508 / Δ F508

Este caso homocigoto para la delección Δ F508 también presentó hasta los 8 meses de edad una evolución clínica excelente con muy buen apetito. La exploración física fue normal. Actualmente recibe suplementación vitamínica y enzimática.

CASO 16: G576A / G1069R

En este caso encontramos las mutaciones G576A y G1069R en heterocigosis. Esta última mutación es una mutación rara que se ha descrito en pacientes con un fenotipo severo a nivel pulmonar y pancreático, aunque asociado a la mutación Δ F508.

Respecto a los datos clínicos, no tiene antecedentes personales conocidos para FQ. Sus padres y hermanos están sanos. El paciente se muestra totalmente asintomático con cloruro en sudor de 28 mEq/L. Dados estos niveles y la ausencia de sintomatología clínica se procede únicamente a revisiones periódicas.

CASO 17: Δ F508 / Δ F508

Este caso homocigoto para la mutación Δ F508 presentó íleo meconial al nacimiento. Debido a su nacimiento reciente, aún no tienen datos clínicos relevantes, recibiendo suplementación nutricional y enzimática.

CASO 18: Δ F508 / Δ F508

Este caso homocigoto para la mutación Δ F508 ingresó al mes y medio de edad por escasa ganancia ponderal. Actualmente recibe suplementación enzimática y vitamínica.

GENOTIPO	CLÍNICA DESTACABLE	CLORURO EN SUDOR (mEq/L)
Δ F508 / 2184insA	-Evolución asintomática.	105
2184insA / G576A	-Evolución asintomática.	N.D.
Δ F508 / R334W	-Evolución asintomática.	77
Δ F508 / R1162X	-Estancamiento ponderal. -Neumonía neumocócica.	N.D.
Δ F508 / D1152H	-Infecciones en vías aéreas superiores.	26
Δ F508 / 2176insC	-Posible hipoproteinemia.	98
711+1G-T / V232D	-Infección por <i>S. aureus</i> . -Consolidación de lóbulo pulmonar.	63
R1162X / E588V	-Evolución asintomática.	72
Δ F508 / L206W	-Desnutrición con afectación pondoestatural.	111
Δ F508 / Δ F508	-Insuficiencia pancreática. -Problemas pulmonares.	N.D.
Δ F508 / Δ F508	-Desnutrición.	101
Δ F508 / R117H	-Estancamiento pondoestatural.	33
Δ F508 / L206W	-Evolución asintomática.	70
Δ F508 / Δ F508	-Evolución asintomática (hasta 8 meses).	N.D.
Δ F508 / Δ F508	-Evolución asintomática (hasta 8 meses).	N.D.
G576A / G1069R	-Evolución asintomática.	28
Δ F508 / Δ F508	-Íleo meconial.	N.D.
Δ F508 / Δ F508	-Escasa ganancia ponderal.	N.D.

-TABLA RESUMEN DE CASOS POSITIVOS DE FQ EN CRIBADO(N.D.:NO DISPONIBLE).

IV.4.- APÉNDICE

IV.4.1.- ESTUDIO MUTACIONAL DE PACIENTES GALLEGOS CON FIBROSIS QUÍSTICA

Tras los dos años iniciales del programa piloto de cribado, dentro del grupo gallego de trabajo en FQ surgió la iniciativa de intentar recopilar toda la información posible acerca de los genotipos de todos los pacientes gallegos diagnosticados con FQ con anterioridad al inicio del programa para intentar obtener así una información más amplia sobre la frecuencia de mutaciones en individuos gallegos. Esta iniciativa surge debido a que los clínicos, hablando con sus pacientes, se dan cuenta de que sólo algunos habían confirmado genéticamente su enfermedad en Galicia (en la mayor parte de esos casos se habían sometido a pruebas genéticas *sencillas* en otras comunidades) por lo cual muchos tenían la genética sin hacer o incompleta.

Esta labor, nunca antes llevada a cabo en nuestra comunidad, resultó imprescindible a la hora de diseñar un chip apropiado para el análisis genético de CFTR en población gallega ya que, hasta la fecha, no existían publicaciones sobre las mutaciones de individuos con FQ en Galicia.

De esta manera, hasta el momento hemos conseguido recopilar información genética acerca de 128 pacientes gallegos con FQ (algunos de ellos ya fallecidos) cuyos genotipos se pueden observar en la siguiente tabla (los espacios vacíos se corresponden con alelos sin mutación identificada):

ALELO 1	ALELO 2
ΔF508	G542X
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508
ΔF508	2184insA
ΔF508	ΔF508
Y1092X	G85V
V562I	V562I
ΔF508	1811+1.6Kb A-G
ΔF508	ΔF508
ΔF508	L206W
ΔF508	R1162X
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508
ΔF508	1811+1.6Kb A-G
ΔF508	ΔF508
ΔF508	R1162X
ΔF508	ΔF508
ΔF508	2184insA
ΔF508	
G542X	2183AA-G
ΔF508	
ΔF508	L206W
G542X	
ΔF508	ΔF508
R1162X	E588V
ΔF508	ΔF508
G542X	1811+1.6Kb A-G
ΔF508	ΔF508
N1303K	711+1G>T
ΔF508	ΔF508
ΔF508	R1162X
ΔF508	R1162X
711+1G>T	
ΔF508	ΔF508
ΔF508	G542X
ΔF508	R334W
ΔF508	R1066C
2184insA	G576A
ΔF508	ΔF508
ΔF508	V232D
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508
S1045Y	S1045Y
1609delCA	
ΔF508	G85E
ΔF508	ΔF508

ΔF508	R347P
ΔF508	G542X
ΔF508	ΔF508
3860ins31	711+1G>T
3860ins31	711+1G>T
3860ins31	711+1G>T
ΔF508	G542X
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508
ΔF508	R1162X
ΔF508	
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508
ΔF508	D1152H
ΔF508	ΔF508
ΔF508	
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508
G542X	V232D
ΔF508	ΔF508
ΔF508	2176insC
875+1G>A	711+1G>T
ΔF508	ΔF508
ΔF508	R1066C
ΔF508	ΔF508
F1052V	
ΔF508	2176insC
ΔF508	
ΔF508	ΔF508
ΔF508	G542X
ΔF508	G85E
ΔF508	G85E
G576A	G1069R
ΔF508	
ΔF508	
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508
ΔF508	Q1100P
ΔF508	ΔF508
621+1G>T	621+1G>T
ΔF508	ΔF508
ΔF508	
Y1381X	Y1381X
ΔF508	R334W

ΔF508	ΔF508
V754M	
ΔF508	D614G
ΔF508	L206W
ΔF508	L159S
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508
ΔF508	A107V
ΔF508	
ΔF508	ΔF508
ΔF508	2176insC
ΔF508	R117H
ΔF508	G542X
ΔF508	ΔF508
ΔF508	G542X
G576A	
ΔF508	M595I
ΔF508	ΔF508
2184insA	
ΔF508	
ΔF508	ΔF508
V754M	D443Y-G576A-R668C
ΔF508	ΔF508
711+1G-T	V232D
ΔF508	ΔF508
ΔF508	ΔF508
ΔF508	2184insA
ΔF508	G542X

-GENOTIPOS DE PACIENTES GALLEGOS CON FQ (EN NEGRITA CASOS DETECTADOS EN CRIBADO).

En muchos de estos pacientes sólo se había identificado un alelo mutado debido a las limitaciones técnicas del momento en que fueron diagnosticados con la enfermedad. Por ello en muchos casos se nos enviaron muestras, además de para realizar un primer estudio genético del paciente, para completar o contrastar estudios genéticos previos.

Hasta el momento, de 129 pacientes identificados en Galicia con FQ, se ha logrado obtener información genética en 123 casos. A continuación muestro una tabla con la frecuencia para las mutaciones de estos pacientes:

MUTACIÓN	ALELOS	PORCENTAJE(%)
$\Delta F508$	146	59,34
Desconocido	14	5,69
G542X	12	4,87
711+1G>T	6	2,43
R1162X	6	2,46
2184insA	5	2,03
G576A	3	1,22
V232D	3	1,22
1811+1.6Kb A-G	3	1,22
3860ins31	3	1,22
L206W	3	1,22
G85E	3	1,22
2176insC	3	1,22
V562I	3	1,22
Y1381X	2	0,81
V754M	2	0,81
S1045Y	2	0,81
R334W	2	0,81
R1066C	2	0,81
621+1G>T	2	0,81
875+1G>A	1	0,41
G85V	1	0,41
L159S	1	0,41
M595I	1	0,41
N1303K	1	0,41
Q1100P	1	0,41
G1069R	1	0,41
R117H	1	0,41
F1052V	1	0,41
R347P	1	0,41
E588V	1	0,41

2183AA-G	1	0,41
1609delCA	1	0,41
D1152H	1	0,41
D614G	1	0,41
D443Y-G576A-R668C (ALELO COMPLEJO)	1	0,41
Y1092X	1	0,41
A107V	1	0,41

-FRECUENCIA DE ALELOS MUTADOS EN PACIENTES GALLEGOS CON FQ.

La frecuencia de la mutación $\Delta F508$ en pacientes diagnosticados con FQ en nuestra comunidad, próxima al 60%, se muestra superior a la encontrada en el cribado pero sigue siendo semejante a la estimada a nivel mundial del 66% (Estivill X *et al*, 1997).

IV.4.1.- PUBLICACIÓN

THREE NOVEL MUTATIONS IN THE CFTR GENE IDENTIFIED IN GALICIAN PATIENTS

Rana-Díez P.^a, Colón C.^b, Alonso-Fernández, J. R.^b, Solar A.^c, Barros-Tizón J.C.^d, Barros-Casas D.^d, Sirvent J.^e, Carracedo A.^a, Barros F.^{a,*}

^a Fundacion Publica Galega de Medicina Xenomica, Grupo de Medicina Xenómica, CIBERER, Santiago de Compostela, 15706 Spain.

^b Unidad de Metabolopatías, Pediatría, CHUS, Santiago de Compostela, 15706 Spain.

^c Unidad de Gastroenterología Pediátrica, Hospital Juan Canalejo, A Coruña, 15006 Spain.

^d Servicio de Neumología, CHUVI, Vigo, 36204 Spain.

^e Unidad de Neumología Pediátrica, Hospital Juan Canalejo, A Coruña, 15006 Spain.

Keywords:

Galicia; Spain; CFTR; mutation; Cystic Fibrosis

Abstract

We report three novel CFTR missense mutations detected in Spanish patients from Galicia (North West of Spain). In the first case, a patient homozygous for a novel S1045Y mutation died due to pulmonary problems. In the other two cases, both heterozygous for novel mutations combined with the F508del mutation, clinical symptoms were different depending on the mutation, detected as M595I and A107V.

1. Introduction

More than 1400 different mutations within the CFTR gene have been described to date [1]. It is known that there are mutations associated with severe cystic fibrosis (CF) phenotype and mutations associated with milder or atypical CF disease. The potential of a mutation to contribute to the phenotype depends on its type, localization in the gene and interactions with secondary modifying factors [2, 3]. It is assumed that nonsense, frameshift and splice site mutations result in the loss of functional CFTR. Missense mutations are more problematical in that they may only partially affect CFTR function. As the amount of functioning CFTR appears to be related to clinical status, some mutations with more modest effect may present congenital absence of the vas deferens with or without mild respiratory disease.

From 2004, when we started sequencing the exonic regions of the CFTR gene in our laboratory, we have sequenced nearly 150 samples of patients from Galicia (North West of Spain) with possible or independently diagnosed cystic fibrosis. From these analyses we discovered three mutations in the CFTR gene not previously described in the literature: one homozygous S1045Y and two compound heterozygous, A107V and

M595I, both combined with the F508del mutation. Each of these is a new missense mutation located in exons 17A, 4 and 13, respectively. No other accompanying mutations were identified after complete sequencing of the CFTR gene in each case.

2. Material and methods

Genomic DNA was extracted from anticoagulated blood using the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega).

The sequencing reaction was performed using the Big Dye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) and analyzed on an ABI 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3. Case reports

Case 1: Patient homozygous for mutation S1045Y

A female born in 1972, nulliparous, diagnosed with allergic bronchial asthma at her local primary healthcare centre with allergic sensibility to dust mites, gramineous pollen and *Aspergillus*. In 1988 she suffered slight acute pancreatitis. In 2001 the patient was diagnosed with bronchopulmonar allergenic aspergillosis.

In 2005 she was hospitalized due to a deterioration of her respiratory symptoms and suggestive data of cystic fibrosis: dyspnoea, productive cough, nasal congestion, diffuse bronchiectasis with central predominance and elevated sweat tests (>90 mEq/L). In the familial study it was found that her only siblings (two brothers) had both died, one of them with biliary pathology and the other with cardiac pathology. In the blood analysis there was leukocytosis (11300 cel/mm³), eosinophilia (8.3%) and a total IgE of 1508 ku/L to *Aspergillus*. In the sputum culture *Candida albicans* was isolated while spirometric tests showed levels: FVC (Forced Vital Capacity) 67%, FEV₁ (Forced Expiratory Volume) 53%, FEV₁/FVC 78%.

From that year the patient suffered many hospitalizations due to respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa*, receiving several cycles of antibiotic treatments and tobramycin inhalation over extended periods. At that moment the possibility of a lung transplant was suggested because of the deteriorating respiratory condition.

In April of 2007 and after many urgent hospitalizations because of worsening breathing symptoms (oxygen saturation 88% with a Ventimask at 100%) the patient was admitted to intensive care, was intubated and connected to a mechanical ventilatory system receiving treatment with antibiotics. After a brief initial improvement the patient suffered a fresh deterioration with leucocytosis and raised fever. *Pseudomonas aeruginosa* and *Morganella morganii* were isolated from cultures.

After the patient stabilized, she was moved to a transplantation unit where copious and thick mucous secretions were found in bronchoscopy throughout the bronchial tree, especially in the upper lobe. At the same time the secretions were cleaned and cultured, showing the presence of *Pseudomonas aeruginosa* with mucoid morphotype. Twelve days later the patient presented an oliguric renal failure and began

a progressive respiratory and haemodynamic deterioration resulting in refractory shock and death three days after.

In this patient we found amino acid change S1045Y: serine (TCT) to tyrosine (TAT) at codon 1045 in exon 17A of CFTR. Interestingly, there are no mutations described in this codon to date.

Further familial studies showed that both parents had the same mutation in heterozygous form and that there was parental consanguinity (first cousins).

Case 2: Patient M595I / F508del

A male born in 1991, the first live birth (two previous stillbirths) with no neonatal pathology. From the first year of life he suffered frequent catarrhs with dry cough at night and distress. He was diagnosed with allergenic rhinitis and bronchial asthma with sensitivity to domestic dust mites in 1999. In a routine consultation the patient showed a sweat test with elevated chloride levels, so was referred to a cystic fibrosis unit.

In 2007 radiology failed to show any pulmonary lesions or gastroenterologic pathology, but chloride levels were still very elevated (>100 mEq/L) while spirometry was also normal. The clinical evolution was practically asymptomatic, showing only bronchial asthma episodes. The age of the patient precluded the ascertainment of the sterility status.

In this patient we found amino acid change M595I: methionine (ATG) to isoleucine (ATA) at codon 595 in exon 13 of CFTR. A previously reported mutation [4] described at the same codon resulted in a change from methionine to threonine. The patient we describe was found to have a F508del mutation in combination with M595I.

Case 3: Patient A107V / F508del

A male born in 1981, diagnosed with clinical symptoms compatible with cystic fibrosis at 8 years old, with a F508del mutation detected at that stage. The patient showed a serious respiratory condition with the following spirometric data: FVC: 40%, FEV₁: 27%, FEV₁/FVC: 55%.

In 1993 he required hospitalization for a thoracic drainage due to a pneumothorax. In 2005 he presented a haemoptysis with embolization where *Staphylococcus maltophilia* and *Staphylococcus aureus* was cultured. In 2007 he was hospitalized again with an important haemoptysis (350cc aprox.) without any other symptoms. Blood analysis showed leucocytosis, microcitic hypochromic anemia and acute respiratory insufficiency. Thorax radiography gave bilateral bronchiectasis with central and left predominance. In the sputum culture *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* were isolated. The haemoptysis was self limited and probably related to a bronchial sepsis. The sweat test showed chloride levels of 96 mEq/L. The patients required substitutive enzymatic treatment with pancreatic enzymes.

In this patient we found an amino acid change A107V from alanine (GCT) to valine (GTT) at codon 107 in exon 4 of the CFTR. A mutation recently described in the same codon resulted in a change from alanine to glycine in a patient with asthenospermia [5].

4. Discussion

We identified three novel missense mutations that led to different amino acid changes in the CFTR protein and to different clinical symptoms in the patients. To predict the possible impact of the amino acid substitutions in the structure and function of the protein, we used the bioinformatic tools Polyphen [6] and Pmut [7] which take into account structural and evolutionary properties to characterize a substitution [8, 9].

The patient homozygous for mutation S1045Y resulted in an amino acid change from serine to tyrosine that appeared to be the cause of a serious cystic fibrosis condition with multiorgan reperussions and fatal consequences for the patient. PolyPhen and Pmut predicted a possibly damaging or pathological reperussion, respectively, for this mutation. The vast majority of mutations are at frequencies under 0.1% or represent private mutations, normally with a background of the F508del major mutation. So, in the simple cystic fibrosis heterozygotes, any effect of the rare point mutations on the products of the normal CFTR gene cannot be estimated directly due to the co-function of the *trans* normal CFTR gene. Therefore rare cases of homozygosity, related in the described case to consanguinity, can help to understand the effect of the respective mutations on CFTR gene function.

The patient with genotype M595I / F508del did not show severe respiratory symptoms. In fact, with appropriate follow up, the patient seemed to be practically asymptomatic. The substitution of methionine for isoleucine in amino acid 595 appeared to show mild clinical effects. In this case the prediction of PolyPhen and Pmut programs gave a perfect correlation with the clinical status of the patient, predicting the mutation to be benign and neutral, respectively.

In the last case, a patient with the A107V / F508del genotype showed important pulmonary problems. The alanine to valine substitution of amino acid 107 appeared to give more serious reperussions in the clinical evolution of the patient. Predictions of the programs were once again in accordance with the symptoms: PolyPhen predicted possibly damaging effects and Pmut pathological effects.

These three cases clearly reflect a common problem in the genetic counselling of cystic fibrosis, specifically that the spectrum of mutations in the CFTR gene gives rise to a highly variable clinical phenotype that may not be predictable from the genotype. In these cases bioinformatics tools can help guide advice given to the patient, but even with such predictions it is impossible to have certainty of the clinical evolution of the condition. In our study we detected three patients each with novel mutations and indicating different clinical evolution, ranging from a patient that was nearly asymptomatic to a patient who died because of the illness.

We also note that these patients would not have been genetically identified using the current recommended panel for CFTR genetic analysis, particularly the panel based on the American College of Medical Genetics guidelines [10]. This panel is used as a standard in many countries and used as the core mutation set to develop different commercial kits. After several years of experience in our laboratory, we have realized the importance of sequencing the whole CFTR gene, especially having identified an allele with a mutation (generally included in commercial kits). It is not unusual to

encounter mutations that are not included in commercial kits and we have experienced this situation on several other occasions in addition to the cases described here.

Finally, case 1 illustrates the importance of an early genetic analysis for patients with suspicion of cystic fibrosis. The patient, homozygous for mutation S1045Y, probably would have been benefit from an early antibiotic treatment avoiding the severe lung problems that finally developed. An early genetic analysis can be useful even for patients showing no clear symptoms of cystic fibrosis in order to avoid this events. Furthermore, the case illustrates the limitations inherent in the use of mutation panels for CF neonatal screening and the necessity of complete CFTR gene analysis or more complete mutation panels. In Galicia we are developing a neonatal screening program based in a panel with all CFTR mutations previously detected in our population, assisted by complete CFTR gene analysis when clinical data indicate suspicion of CF.

TABLE : New CFTR mutations found in Galician patients and bioinformatic predictions.

AA CHANGE	EXON	POLYPHEN ^a	PSIC ^b	PMUT ^c	RELIABILITY ^d
S1045Y	17A	Possibly damaging	1.864	Pathological	7
M595I	13	Benign	1.310	Neutral	3
A107V	4	Possibly damaging	1.602	Pathological	2

a Polyphen prediction about the impact of the aminoacid substitution on the function of the protein.

b Polyphen value which correlates with the probability of one missense mutation to be pathogenic. Large differences in PSIC score (above 1.5) may indicate that the substitution of interest is rarely or never observed in the protein family.

c PMUT prediction about the pathological character of the mutation.

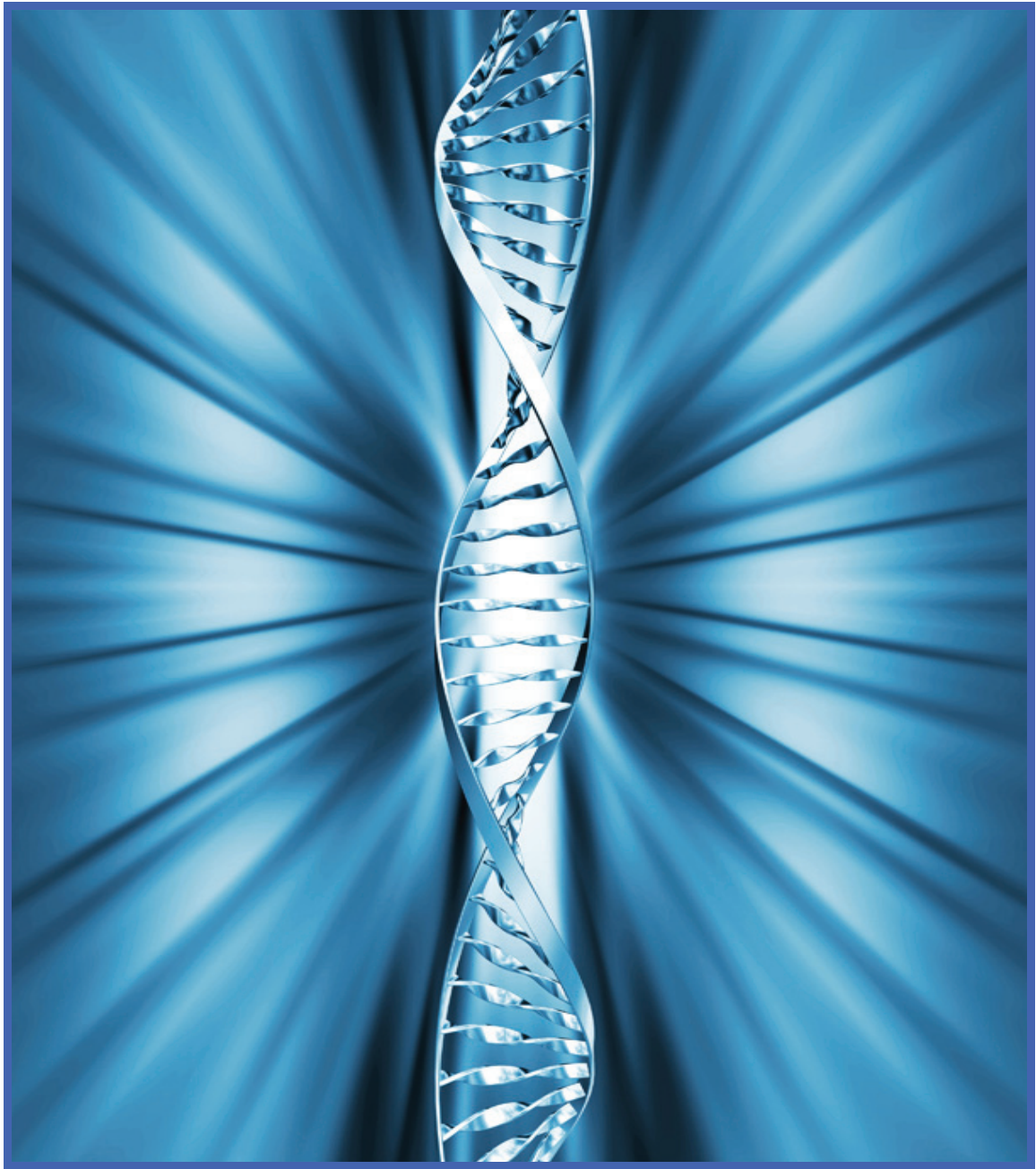
d PMUT index which values vary between 0 and 9. Low values correspond to poorer predictions and higher values to better predictions.

Acknowledgments

We would like to thanks Chris Phillips for critically reading the manuscript and useful advice.

References

- [1] Human Genome Mutation Database (Biobase): <http://www.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=CFTR>. Accession date: 18/03/2008.
- [2] Slieker MG, Sanders EA, Rijkers GT, Ruven HJ, van der Ent CK. Disease modifying genes in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2005;4:7-13.
- [3] McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2003;361:1671-6.
- [4] Pasquet M C, Baudis M, Creveaux I, Kitzis A. Cystic Fibrosis Mutation Database, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/MutationDetailPage.external?sp=1493>. Accession date: 18/03/2008.
- [5] Anguis A, Stasi M, Furbetta M. Cystic Fibrosis Mutation Database, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/MutationDetailPage.external?sp=1629>. Accession date: 18/03/2008.
- [6] <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>. Accession date: 18/03/2008.
- [7] <http://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/>. Accession date: 18/03/2008.
- [8] Stone EA, Cooper GM, Sidow A. Trade-offs in detecting evolutionarily constrained sequence by comparative genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005;6:143–64.
- [9] Ferrer-Costa C, Gelpi JL, Zamakola L, Parraga I, de la Cruz X, Orozco M. PMUT: a web-based tool for the annotation of pathological mutations on proteins. *Bioinformatics* 2005;21:3176–78.
- [10] Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, Mennuti M, et al. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet Med* 2004;6:387-91.



CONCLUSIONES

V.1.- CONCLUSIONES

1.- Se ha desarrollado un método de secuenciación directa y un método de genotipado por espectrometría de masas para el análisis genético del gen CFTR en los pacientes con fibrosis quística.

2.- La metodología de espectrometría de masas (Sequenom MassARRAY®) se ha mostrado como idónea para programas de cribado neonatal permitiendo un genotipado fiable y rápido de un gran número de muestras a un coste bajo. Asimismo, su flexibilidad permite una fácil introducción de nuevas mutaciones a estudio en los sucesivos diseños.

3.- El protocolo de actuación desarrollado permite el empleo de las muestras remitidas al nacimiento para la realización de pruebas metabólicas, siendo éstas suficientes para el análisis con chips e incluso para la secuenciación directa del gen, sin necesidad de ocasionar molestias a las familias para la petición de nuevas muestras.

4.- El panel desarrollado permite la detección de un porcentaje muy elevado de los posibles afectados con la enfermedad que, sin ser el 100%, se mantiene cercano gracias a la adición de las nuevas mutaciones que vamos encontrando en nuestra población a los paneles de estudio.

5.- La cobertura de análisis de nuestro panel es muy superior a la mayoría de las ofrecidas por otros laboratorios y a la recomendada por organismos estadounidenses (*American College of Medical Genetics*) y europeos (*European Cystic Fibrosis Society*). De los 11 casos detectados durante el período 2006-2007, 4 (36 %) no lo hubieran sido utilizando el panel estándar estadounidense.

6.- Los datos del programa piloto de cribado muestran una prevalencia al nacimiento en nuestra comunidad de 1/5835, semejante aunque ligeramente inferior a la de otras regiones españolas con programas de cribado.

7.- La frecuencia de la mutación $\Delta F508$ en los casos identificados con fibrosis quística durante el programa piloto de cribado es del 55,55 %, semejante a la descrita en la literatura por otros estudios en población española.

8.- Han aparecido dos ayuntamientos gallegos con incidencias muy elevadas de fibrosis quística (1/397, 1/163).

9.- Se ha llevado a cabo un estudio acerca de la información genética de los pacientes gallegos diagnosticados con FQ con anterioridad al programa piloto de cribado que nos ha permitido elaborar un mapa mutacional de nuestra comunidad.



ANEXOS

ANEXO I.- PRIMERS DE AMPLIFICACIÓN Y EXTENSIÓN EN CHIP-CFTR VERSIÓN 2006.

ENSAYO	VARIACIÓN	PRIMER AMPLIFICACIÓN-2	PRIMER AMPLIFICACIÓN-1	PRIMER DE EXTENSIÓN
Iplex 1	D1270N	ACGTTGGATGAAGGCTTCTCCACTGTTG	ACGTTGGATGAGACTACTGAACACTGAAGG	TCCCAAGACACCCAT
Iplex 1	R553X	ACGTTGGATGGAAGGTGAATCACACTGAG	ACGTTGGATGCAGCAAATGCTGTAGACC	ACTGAGTGGAGGTCAA
Iplex 1	DEL21k1	ACGTTGGATGGCCTCATGAACAATTAACCTC	ACGTTGGATGGCAGTAATCACTTGGTCAGC	ACACAAGGCTTGTCTTT
Iplex 1	Q890X	ACGTTGGATGCTCTATTGTCTTACAGCAC	ACGTTGGATGGGTGCTGGTGATAATCACTG	CTTTACAGCACTCCTCTT
Iplex 1	1717-1A	ACGTTGGATGGTGATTCCACCTTCTCCAAG	ACGTTGGATGGCATACTAAAAGTGAATCTC	TGCAAACTTGGAGATGTC
Iplex 1	G1244E	ACGTTGGATGAAAGTACTTCTCCCTGATCC	ACGTTGGATGGTCACAGAAGTATCCCATC	cTTCCCTGATCCAGTCTT
Iplex 1	405+3C	ACGTTGGATGGTGATACATAATGAATGTAC	ACGTTGGATGCGGCGATGTTTTCTGGAG	GAATGTACAAATGAGATCCT
Iplex 1	2789+5G-A	ACGTTGGATGGTCTTGTCCATTCACAGTG	ACGTTGGATGCACAATCTACACAATAGGAC	gTGTGGCTCTTGGAAAGTGA
Iplex 1	R709X	ACGTTGGATGAACAGACTGGAGATTGGG	ACGTTGGATGGGGAGTCTTTGCACAATGG	TCTCAATCCAATCAACTCTATA
Iplex 1	R347H	ACGTTGGATGACCATGTTTGTACAGCCCAG	ACGTTGGATGTCAACCATCTCATTCTGC	GAAATGGCAGTGAACGCCATG
Iplex 1	E92K	ACGTTGGATGGTGTGAAATCTCAGGGTA	ACGTTGGATGAGAGAGGCTGTACTGCTTTG	cTCTCTGTTTTCCCTTTTGTAG
Iplex 1	G576A	ACGTTGGATGGCAGTATACAAAGATGCTGA	ACGTTGGATGCAAAAGACATACCTTTCAA	TGTAATTTATAGACTCTCCTTTT
Iplex 1	3199del6	ACGTTGGATGCAACCTACATCTTTGTTGC	ACGTTGGATGAGTTGCTGTGAGTTTGGAG	ATCTTTGTGCAACAGTGCCAGTG
Iplex 1	F1074L	ACGTTGGATGGTACAAGAACCAGTTGGCAG	ACGTTGGATGTATGACACTTCGTGCCCTC	gAGAGCTTTGTGGAACAGAGTTTC
Iplex 1	R1158X	ACGTTGGATGTGTGAAATGTCTGCCATT	ACGTTGGATGGAACCTAAAGACTCGGCTC	AATGTGTTATTTTATTTTCAGATG
Iplex 1	3849+10Kb-C	ACGTTGGATGACATTTCTTTCAGGGTGTG	ACGTTGGATGCTGGAGACCACAAGGTAATG	gCATTTCTCTTTCAGGGTGTCTACTC
Iplex 1	P205S	ACGTTGGATGCATTGGCACAATTCGTGTGG	ACGTTGGATGAACACTCCAGATTAGCCC	CATTGGCACAATTCGTGTGGATCGCT
Iplex 1	621+1G-T	ACGTTGGATGCAGAAATATATGTCCATGGG	ACGTTGGATGGGAATGCAGATGAGAATAGC	aATGGGCTGTGCAAGGAAGTATTA
Iplex 1	875+1G-A	ACGTTGGATGGCTAGGGAGAATGATGATG	ACGTTGGATGCTGGTTTTACTAAAGTGGGC	CTAGGAGAAATGATGATGAAGTACAG
Iplex 1	V232D	ACGTTGGATGATCTGGGAGTGTACAGGC	ACGTTGGATGATCATCTTCTCCCTAGCCC	CCTTCTGTGGACTTGGTTTCTGATAG
Iplex 2	W1282X	ACGTTGGATGCTGTGGTACTCTCCAAAGG	ACGTTGGATGATCCAGATCGATGGTGTGTC	CTCCAAAGGCTTCTCT
Iplex 2	L206W	ACGTTGGATGCATTGGCACAATTCGTGTGG	ACGTTGGATGAACACTCCAGATTAGCCC	CGTGTGGATCGCTCCTT
Iplex 2	S549R	ACGTTGGATGTTCTTGAGAAAGGTGGAATC	ACGTTGGATGCAGCAAATGCTGTAGACC	GGTGGAAATCACACTGAG
Iplex 2	E692X	ACGTTGGATGGAATCTCTCTTTTTCCTC	ACGTTGGATGTAGAAGGAGATGCTCCTGTC	TTCCTTTTTCCTCCAAACT
Iplex 2	R668C	ACGTTGGATGGGATGTGATTCTTTCGACC	ACGTTGGATGAGGAGCATCTCCTCTAATG	CCTAACTGAGACCTTACAC
Iplex 2	2869insG	ACGTTGGATGCAGTGATTATCACCAGCACC	ACGTTGGATGCCATAGCAAGCAAGTGTGTC	tTACCAGCACCAGTTCGT
Iplex 2	N1303K	ACGTTGGATGTCCTCACTGTTTCATAGGG	ACGTTGGATGCTTCTTCTTTTCTTTTTC	ggCTGTTCAAGGGATCCAA
Iplex 2	G480C	ACGTTGGATGGATTATGGGAGAACTGGAGC	ACGTTGGATGAATGGTGCCAGGCATAATCC	GAGAACTGGAGCCTTCAGAG
Iplex 2	S1251N	ACGTTGGATGTACCTTATAGGTTGGGCCCTC	ACGTTGGATGCTTCAGTGTTCAGTAGTCTC	ggGAACCTGGATCAGGGAAGA
Iplex 2	3601-111G-C	ACGTTGGATGGTTCATTGAAAAGCCCGAC	ACGTTGGATGCACAATTAGTTGATGCTTCC	cAAAGCCCGACAAATAACCAA
Iplex 2	R75Q	ACGTTGGATGACAAATGAGATCTTACCCC	ACGTTGGATGCTCTAAACTCATTATAGCCC	CATAAATCTCCAGAAAAACAT
Iplex 2	G314E	ACGTTGGATGTAGTCATAGGGAAGCACAG	ACGTTGGATGAGGCAGCCTATGTGAGATAC	tGATAAAACACCACAAAGAAC
Iplex 2	3849+4G	ACGTTGGATGGGCTACTGGGATTCACCTTAC	ACGTTGGATGCCTTCTCAATAAGTCTGGC	ggAAAGCAAGCAGTGTCAAATC
Iplex 2	Y1014C	ACGTTGGATGAAAGCCACTATCACTGGCAC	ACGTTGGATGTGAGCTATAGCAGTTGTCG	ggGGCACTGTTGCAACAAAGATG
Iplex 2	L997F	ACGTTGGATGACTGCTATAGCTCCAATCAC	ACGTTGGATGACACACTTTGTCCTATTGTC	ccTAGCTCCAATCACAATTAATAA
Iplex 2	A120T	ACGTTGGATGCCTCACAATAAGAGAAGGC	ACGTTGGATGCCTATGACCCGGATAACAAG	cTAAGCCTATGCCTAGATAAATCG
Iplex 2	DELTA1507	ACGTTGGATGTATGCCTGGCACCATTAAAG	ACGTTGGATGGCATGCTTTGATGACGCTTC	cCCTGGCACCATTAAAGAAATATC
Iplex 2	R1066C	ACGTTGGATGTTCAAGTAAGGCTGCCGTC	ACGTTGGATGGGAGGAGTCCAATTTTAC	AAGTAAGGCTGCCGTCCGAAGGCAC
Iplex 2	D1152H	ACGTTGGATGGATGATAAGCTTACCAAGC	ACGTTGGATGCATGAGTACATTGCAAGTGGG	ccTAAGACTTACCAAGCTATCCACAT
Iplex 2	T351S	ACGTTGGATGTCAACCATCTCATTCTGC	ACGTTGGATGACCATGTTTGTACAGCCCAG	ggGCATTGTTCTGCGCATGGCGGTCA
Iplex 2	S42F	ACGTTGGATGAGAAAGGATACAGACAGCG	ACGTTGGATGTTCAGATAGATTGTCAGCAG	tATTGTACAGATATACCAAAATCCCTT
Iplex 2	3120+1A	ACGTTGGATGCAGACATACTTAACGTTACT	ACGTTGGATGTTTGGATGACCTTCTGCCTC	ATACTTAACGGTACTTATTTTACATA
Iplex 3	2143delT	ACGTTGGATGGTTTCTGTCCAGGAGACAGG	ACGTTGGATGCCTAACTGAGACCTTACACC	AGGAGCATCTCCTTCTA
Iplex 3	712-1G-T	ACGTTGGATGCCACACGAAATGTGCCAATG	ACGTTGGATGGTGGAAAGATACAATGACACC	agGTGCCAATGCAAGTCC
Iplex 3	4005+1G-A	ACGTTGGATGTTGCAACAGTGGAGGAAAGC	ACGTTGGATGGCCTTTTTCTGCGCTAAGTC	TTTGGAGTGATACCACAG
Iplex 3	R117C	ACGTTGGATGCCTATGACCCGGATAACAAG	ACGTTGGATGCCTCACAATAAGAGAAGGC	aCGGATAACAAGGAGGAA
Iplex 3	K710X	ACGTTGGATGAACAGACTGGAGATTGGG	ACGTTGGATGGGAGTCTTTGCACAATGG	TCCAATCAACTCTATACGA
Iplex 3	3876delA	ACGTTGGATGTTACCT TATAGGTGGGCTC	ACGTTGGATGCTTCAGTGTTCAGTAGTCTC	aaTTGGGAAGAACTGGATC
Iplex 3	S1045Y	ACGTTGGATGTTTCTCCAAACCTCACAGC	ACGTTGGATGGATGAGTATCGCACATTAC	tCAACTCAAAACACTGGAAT
Iplex 3	A1006E	ACGTTGGATGTGAGGGTTGAAAACCTGCG	ACGTTGGATGCTCACCACATGTTTCTTTG	agTGTAACACTGCGACAAC
Iplex 3	F508C	ACGTTGGATGGCATGCTTTGATGACGCTTC	ACGTTGGATGTATGCTGGCACCATTAAAG	TATTCAATAGAGAAACACCA
Iplex 3	1898+3A-G	ACGTTGGATGGCATGACATTATAAGTAAGG	ACGTTGGATGAGACTCTCCTTTTGGATACC	AAGTAAGGTATTCAAGAAACA
Iplex 3	R75Q	ACGTTGGATGACAAATGAGATCCTTACCCC	ACGTTGGATGTCTAAACTCATTATAGCCC	CATAAATCTCCAGAAAAACAT
Iplex 3	I807M	ACGTTGGATGACACGAAAGTGTCACTGGC	ACGTTGGATGGCCAGTTTCTTGAGATAACC	gAAACTTGACTGAACCTGGATAT
Iplex 3	I148T	ACGTTGGATGCCTACACCCAGCCATTTTGG	ACGTTGGATGCTGTGCAAGGAAGTATTACC	agaCATTTTGGCCCTTCATCACA
Iplex 3	R352Q	ACGTTGGATGACCATGTTTGTACAGCCCAG	ACGTTGGATGTCAACCATCTCATTCTGC	gtgGTACAGCCAGGGAATTGC

Iplex 3	W1089X	ACGTTGGATGAACGAGCGAGTGTGACAG	ACGTTGGATGCGGCAGCCTTACTTTGAAAC	gaAGTGTGACAGGTACAAGAAC
Iplex 3	A561E	ACGTTGGATGGGTATCCAAAAGGAGAGTCTA	ACGTTGGATGCCAGGAAATAGAGAGGAAATG	tcCAAATCAGCATCTTTGTATACT
Iplex 3	Q493X	ACGTTGGATGAATGGTGCCAGGCATAATCC	ACGTTGGATGGATTATGGGAGAACTGGAGC	GTGCCAGGCATAATCCAGGAAAACT
Iplex 3	M952I	ACGTTGGATGAGGGTTGACATAGGTGCTTG	ACGTTGGATGTCTACCACTGGTGCACTC	gAGGTGCTTGAAGAACAGAATGTAA
Iplex 3	1717-8G-A	ACGTTGGATGAGAAGGAAGATGTGCTTTTC	ACGTTGGATGTCTGCAAACTTGGAGATGTC	AAGTGACTCTCTAATTTTCTATTTTT
Iplex 3	711+5G-A	ACGTTGGATGCTCCGCTTCCAGTTGTAT	ACGTTGGATGTCCTTCCAACAACCTGAAC	TGCCTAAAAGATTAATCAATAGGTA
Iplex 3	2603delT	ACGTTGGATGGGTATCTCAAGAACTGGC	ACGTTGGATGCCCAAGCGATGATACCTAC	gaTGGCTTGGAAATAAGTGAAGAAAT
Iplex 3	P5L	ACGTTGGATGAAGTTTGGAGACAACGCTGG	ACGTTGGATGTTAGGAGCTTGAGCCAGAC	gTGGAGACAACGCTGGCCTTTCCAGA
Iplex 4	Q1100P	ACGTTGGATGCTGTACCTGTCAACACTGC	ACGTTGGATGTGAAGGTAAACAGCAATGAAG	ACACTGCGCTGGTTCC
Iplex 4	R1162X	ACGTTGGATGGTCTGCCATTCTTAAAAAC	ACGTTGGATGTTACCTTCTGTTGGCATGTC	GATGCGATCTGTGAGC
Iplex 4	V520F	ACGTTGGATGCTTACCTCTCTAGTTGGC	ACGTTGGATGTATGCTGGCACCATTAAAG	cTGGCATGCTTTGATGA
Iplex 4	E60X	ACGTTGGATGATGCAACTTATTGGTCCAC	ACGTTGGATGCGCCGAAGGGCATTAAATGAG	GCAGAGAATGGGATAGA
Iplex 4	1078delT	ACGTTGGATGAGGCAGCCTATGTGAGATAC	ACGTTGGATGTAGTCATAGGGAAGCACAG	CTTCTCTCAGGGTCTCT
Iplex 4	2183AA-G	ACGTTGGATGTAGAAGGAGATGCTCTGTC	ACGTTGGATGTTTCCCAAACTCTCCAGTC	CCTGGACAGAAACAAAA
Iplex 4	Q1313X	ACGTTGGATGACTTGGATCCCTATGAACAG	ACGTTGGATGTCAAGTACAGCCTTACCTC	aTATGAACAGTGGAGTGAT
Iplex 4	3860ins31	ACGTTGGATGCAGAAGTATCCATCACTTT	ACGTTGGATGGTACTCTTCCCTGATCCAGT	cCCTTATAGTGGGCTCTT
Iplex 4	Y122X	ACGTTGGATGAAATGGCTGGGTAGGAG	ACGTTGGATGACAAGGAGGAACGCTCTATC	AGGCATAAGCCTATGCCTAG
Iplex 4	R347P	ACGTTGGATGACCATGTTGTACAGCCAG	ACGTTGGATGTCAACCATCTCATTCTGC	ccccCCGAGTGACCCCATG
Iplex 4	G178R	ACGTTGGATGACGGTTGTTGAAAGGAGAC	ACGTTGGATGAAAGCTGTCAAGCCGTGTC	AAAGGAGACTAACAAGTTGTC
Iplex 4	405+1A	ACGTTGGATGCATAATGAATGACAAATGAG	ACGTTGGATGCGGCGATGTTTTCTGGAG	GAATGTACAAATGAGATCCTTA
Iplex 4	A559T	ACGTTGGATGCAGCAATGCTTGCTAGACC	ACGTTGGATGAATCACACTGAGTGGAGGTC	CCAATAATAGTTATTACCTTG
Iplex 4	1811+1.6kbA-G	ACGTTGGATGCAGAAGTACCAACAATTAC	ACGTTGGATGCAGGTGTGATTGATAGTAAC	atAGAATCCTATGTAATTGAGAT
Iplex 4	F1052V	ACGTTGGATGAAGGCACGAAGTGCCATAG	ACGTTGGATGGGAAATATTTACAGGCAGG	ggAGCTTGAACAAGATGAGTGA
Iplex 4	L967S	ACGTTGGATGGATGGTGGATCAGCAGTTTC	ACGTTGGATGAAGCAGCTATGTCAACCTC	ctACCTAGTAAAGTACCTGCTTTC
Iplex 4	L571S	ACGTTGGATGCCATTTCTTTTACAGCAG	ACGTTGGATGACATCTAGGTGCAAAAGG	ACAAAAGATGCTGATTTGTATTAT
Iplex 4	R851X	ACGTTGGATGACTAAGCACCATAATAGCAC	ACGTTGGATGCAGCAGTACTACATGGAAC	cccCTCTTGTGACAGTAATATATC
Iplex 4	711+3A-T	ACGTTGGATGCTCTTCCAACAACCTGAAC	ACGTTGGATGCTCCGCTTTCCAGTTGTAT	gcacCCTGAACAAATTTGATGAAGT
Iplex 4	S1235R	ACGTTGGATGTACAGAGAAGTGGAAATGC	ACGTTGGATGGCAGTGTTCAATCTCACCC	cTAGAGAACATTTCTCTCAATAAG
Iplex 4	1609delCA	ACGTTGGATGAATGGTGCCAGGCATAATCC	ACGTTGGATGGATTATGGGAGAACTGGAGC	tgggGCCAGGCATAATCCAGGAAAAAC
Iplex 5	G673X	ACGTTGGATGTTCCCAAACTCTCCAGTC	ACGTTGGATGCTGAGACCTTACACCGTTTC	GAGACAGGAGCATCTC
Iplex 5	G542A	ACGTTGGATGATTCTTGCTGTTGACCTCC	ACGTTGGATGGGACATCTCCAAGTTTGAC	GTGTGATTCCACCTTCT
Iplex 5	R74W	ACGTTGGATGCCATAGAACATAATCTCCAG	ACGTTGGATGAGAATGGGATAGAGAGCTGG	TCCAGAAAAACATCGCC
Iplex 5	L1065R	ACGTTGGATGTTCAAAGTAAGGCTGCCGTC	ACGTTGGATGGGCAGGAGTCCAATTTTAC	gCCCGTCCGAAGGCACGA
Iplex 5	R334W	ACGTTGGATGTGCAGAAATGAGATGGTGGTG	ACGTTGGATGTCTCAGGGTCTTTGTGGTG	ATGTTGGTGAATATTTTTC
Iplex 5	3659delC	ACGTTGGATGCTTTCGAGAGTTGGCCATTTC	ACGTTGGATGCTGTGAGCCGAGCTTTAAG	GTATGGTTTGGTGGATCTTG
Iplex 5	936delTA	ACGTTGGATGCCAGCAGTATGCCTTAACAG	ACGTTGGATGGTGAAGACTTGTGATTACC	GTATGCCTTAACAGATTGGAT
Iplex 5	3905insT	ACGTTGGATGAGAACTGGATCAGGGAAGAG	ACGTTGGATGCAAGACACACCATCGATCTG	GTACTTTGTTATCAGCTTTTTT
Iplex 5	3272-26A-G	ACGTTGGATGAAATGGACTCTGCCTGTG	ACGTTGGATGAGTCTTTTTCAGGTACAAG	GTGAAATATTTCCATAGAAAAACA
Iplex 5	R117H	ACGTTGGATGCCTCACAATAAGAGAAGGC	ACGTTGGATGCCTATGACCCGGATAACAAG	TGCCTAGATAAATCCGATAGAG
Iplex 5	M1101K	ACGTTGGATGTGAAGTAACAGCAATGAAG	ACGTTGGATGCTTGTACCTGTCAACACTGC	ATGACAAAAATCAATTCTATTCTC
Iplex 5	DELTA508	ACGTTGGATGTATGCCTGGCACCATTAAAG	ACGTTGGATGGCATGCTTTGATGACGCTTC	cgGGCACCATTAAAGAAAAATCAT
Iplex 5	Y1381X	ACGTTGGATGGTGAATCAGCAAAATGCTTG	ACGTTGGATGGTCTGTGATATTATGTGTGG	TGTTTATAGTCTCTTAATTATTTG
Iplex 5	1898+1A	ACGTTGGATGAGACTCTCTTTTGGATACC	ACGTTGGATGGCATGAGCATTATAAGTAAGG	TTAACAGAAAAAGAAATTTTGAAAG
Iplex 5	1812-1G-A	ACGTTGGATGCCAGGAAATAGAGGAAATG	ACGTTGGATGGGTATCCAAAAGGAGAGTCTA	TGTAATTTAATTTCCATTTTCTTTTA
Iplex 6	S549N	ACGTTGGATGCAGCAATGCTTGCTAGACC	ACGTTGGATGTTCTTGGAGAAGGTGGAATC	TGCTCTTGACCTCCA
Iplex 6	A455E	ACGTTGGATGAAGAACTACCTTGCTGCTC	ACGTTGGATGTGGTACTCCTGTCTGAAAG	AGTGGATCCAGCAACC
Iplex 6	Q1281X	ACGTTGGATGCTGTGGTATCACTCCAAGG	ACGTTGGATGATCCAGATCGATGTTGTGTC	AAAGGCTTTCTCCACT
Iplex 6	2184insA	ACGTTGGATGTACAGCCAGGGAATTTG	ACGTTGGATGCTCCGAAAAATTCACCAC	GCAGAACATGCGAAT
Iplex 6	F316L	ACGTTGGATGAGGCAGCCTATGTGAGATAC	ACGTTGGATGTAGTCATAGGGAAGCACAG	CTTCTCTCAGGGTCTCT
Iplex 6	H199Y	ACGTTGGATGTTGCAAGGAGCGATCCACA	ACGTTGGATGGGAAGATACAATGACACCTG	GAGCGATCCACAGCAAAAT
Iplex 6	V754M	ACGTTGGATGAGATTCTGAGCAGGAGAGG	ACGTTGGATGTCAGGTTCAAGCAGACTGC	ccTACTGCCTCGCATCAGC
Iplex 6	2184delA	ACGTTGGATGTAGAAGGAGATGCTCTGTC	ACGTTGGATGTTTCCCAAACTCTCCAGTC	CCTGGACAGAAACAAAAA
Iplex 6	Q30X	ACGTTGGATGGGACCAGACCAATTTTGAGG	ACGTTGGATGCAGCAAGTCAACAGAAGGG	TTTGAGGAAGGATACAGA
Iplex 6	Y1092X	ACGTTGGATGCGGCAGCCTTACTTTGAAAC	ACGTTGGATGCTCATTTGGAACAGCGCAG	cCTGCCAAGTGGTCTTGTA
Iplex 6	1711+1G-T	ACGTTGGATGCTTTTCCAACAACCTGAAC	ACGTTGGATGCTCCGCTTTTCCAGTTGTAT	ACCTGAACAAATTTGATGAA
Iplex 6	3667del4	ACGTTGGATGCTGTGAGCCGAGTCTTAAG	ACGTTGGATGCTTTCAGAGTTGCCATTTC	acGGTAAACCTACCAAGTCAA
Iplex 6	T582R	ACGTTGGATGAGACTCTCTTTTGGATACC	ACGTTGGATGGCATGAGCATTATAAGTAAGG	TTTGGATACCTAGATGTTTAA
Iplex 6	1716G/A	ACGTTGGATGAGTGTGAAGGGTTTATATGC	ACGTTGGATGCGTCATCAAGCATGCCAAC	AAAAGTTTTCACATGTTCTTAC
Iplex 6	G85E	ACGTTGGATGACAAATGAGATCCTTACCCC	ACGTTGGATGATTAATGCCCTTCGGCGATG	CCTTACCCCTAAATATAAAAGATT

ANEXO II.- PRIMERS DE AMPLIFICACIÓN Y EXTENSIÓN EN CHIP-CFTR VERSIÓN 2007.

ENSAYO	VARIACIÓN	PRIMER AMPLIFICACIÓN-2	PRIMER AMPLIFICACIÓN-1	PRIMER DE EXTENSIÓN
Iplex1	D1270N	ACGTTGGATGAGACTACTGAACACTGAAGG	ACGTTGGATGAAGCCTTCTCCACTGTTG	CCCAAGACACACCAT
Iplex1	P205S	ACGTTGGATGAACAACTCCAGATTAGCCC	ACGTTGGATGCATTGGCACATTTCTGTGG	TTCGTGGATCGCT
Iplex1	3860ins31	ACGTTGGATGGTACTCTTCCCTGATCCAGT	ACGTTGGATGCAGAAAGTATCCCATCACTTT	ATAGTGGGCTCTT
Iplex1	Y913C	ACGTTGGATGCCATAGCAAGCAAGTGTC	ACGTTGGATGCAGTGATTATCACCAGCAC	ccCGACACCAAGTTCGT
Iplex1	2143delT	ACGTTGGATGCCCTAAGTACCTTACACC	ACGTTGGATGGTTTCTGTCCAGGAGACAGG	AGGAGCATCTCTCTTA
Iplex1	Q1313X	ACGTTGGATGTCAGTTAGCAGCTTACCTC	ACGTTGGATGACTGGATCCCTATGAACAG	ATGAACAGTGGAGTGAT
Iplex1	3849+4A-G	ACGTTGGATGCCCTTCAATAAGTCTGGC	ACGTTGGATGGGCTACTGGGATTCACCTAC	GCAAGCAGTGTTCAAATC
Iplex1	2789+5G-A	ACGTTGGATGCACAATCTACAAATAGGAC	ACGTTGGATGGTCTTGTTCATTCCAGGTG	ctGCTCTTGGAAAGTGA
Iplex1	F1052V	ACGTTGGATGAAGGCACGAAGTGCCATAG	ACGTTGGATGGGAAATATTTACAGGCAGG	gagGGCAGGATCCAATT
Iplex1	S1196X	ACGTTGGATGACAAGATGGCCAACTCTCG	ACGTTGGATGAGGCCAGATGTCATCTTC	tTCATCTTTCTTCACGTGT
Iplex1	4521G-A	ACGTTGGATGGGAACCTAAGCAAGTGCAAG	ACGTTGGATGAGCCTTGATCTTGCACTC	ccaTCTTTCAGAGCAGCAAT
Iplex1	A120T	ACGTTGGATGCCATGACCCGGATAACAAG	ACGTTGGATGCCCTACAATAAGAGAAGGC	GCCTATGCCATAGATAAATCG
Iplex1	A455E	ACGTTGGATGGTACTCTGTCTGAAAG	ACGTTGGATGAAGAACTACCTGCCTGCTC	gggaAGTGGATCCAGCAACC
Iplex1	Y1092X	ACGTTGGATGCGGACGCTTACTTTGAAAC	ACGTTGGATGCTCATTGGAAACAGCGCAG	ggaagGCGCAGTGTGACAG
Iplex1	Q890X	ACGTTGGATGGGTGCTGGTGATAACTCTG	ACGTTGGATGTCCTATTTGCTTTACAGCAC	agttCTTTACAGCACTCTCTT
Iplex1	2307insA	ACGTTGGATGCCATTGTGCAAAAGACTCCC	ACGTTGGATGACTAAGGACAGCTTCTCTC	cAAGGCTCATCAGAATCCTCTT
Iplex1	P5L	ACGTTGGATGAAGTTTGGAGACAACGCTGG	ACGTTGGATGTTAGGAGCTTGAGCCAGAC	gggagACCATGCAGAGGTGCG
Iplex1	1717-8G-A	ACGTTGGATGAGAAGGAGATGTCCTTTTC	ACGTTGGATGCTGCAAACTGGAGATGTC	CAAACCTGGAGATGTCCTATTAC
Iplex1	3199del6	ACGTTGGATGAGTTGCTGTGAGGTTGGAG	ACGTTGGATGCAACCTACATCTTTGTTC	ggggaAGTTGCAACAGTCCAGTG
Iplex1	1716G-A	ACGTTGGATGCGTCATCAAGCATGCCAAC	ACGTTGGATGAGTGTAAGGGTTCATATGC	AAAAGTTTTACATAGTTTCTTAC
Iplex1	1677delTA	ACGTTGGATGTATGCTGGCACCATTAAAG	ACGTTGGATGGCATGCTTTGATGACGCTC	ggttgATGACGCTTCTGTATCTAT
Iplex1	S42F	ACGTTGGATGTTGATAGATTGTCAGCAG	ACGTTGGATGAGGAAAGGATACAGACAGCG	tgGTCAGACATATACCAATCCCTT
Iplex1	G330X	ACGTTGGATGCTCAGGGTCTTTGTGGTG	ACGTTGGATGTGCAGAAATGAGATGGTGGTG	ggggATATTTTCCGGAGGATGATTC
Iplex1	P67L	ACGTTGGATGGCAGAGATGGGATAGAGAG	ACGTTGGATGGAACCAATCGCCGAAGGG	gggtCGAAGGGCATTATGAGTTTA
Iplex1	405+1G-A	ACGTTGGATGCGGCGATGTTTTCTGGAG	ACGTTGGATGCATAATGAATGTACAAATGAG	tcATGAATGTACAAATGAGATCCTTA
Iplex1	I807M	ACGTTGGATGGCCAGTTCTTGAGATAACC	ACGTTGGATGACAGCAAAAGTCTACTGGC	tttGCAAACTTGACTGAACTGGATAT
Iplex1	875+1G-A	ACGTTGGATGCTGTTTTACTAAAGTGGGC	ACGTTGGATGGGCTAGGGAGAATGATGATG	ttatGGAGAATGATGATGAAGTACAG
Iplex1	G551D	ACGTTGGATGGAGAAGTGGAAATCACACTG	ACGTTGGATGCAGCAAACTGCTGTAGACC	aggggTAAAGAAATCTTGCTCGTTGA
Iplex1	3849+10Kb-C	ACGTTGGATGCTGGAGACCACAAGTAATG	ACGTTGGATGACATTTCTTTCAGGGTGTG	acaccTTTCTTTCAGGGTGTCTTACTC
Iplex1	2055del9-A	ACGTTGGATGCTTCTGCACTAAATGGTCTG	ACGTTGGATGGAACCTCAAAATCTACAGCC	aaaTCCAAATCTACAGCCAGACTTTAG
Iplex1	L159S	ACGTTGGATGCCACACCCAGCCATTTTGG	ACGTTGGATGCTGTGCAAGGAAGTATTACC	GCAAGGAAGTATTACCTTCTTAAATC
Iplex1	444delA	ACGTTGGATGCCCTTTTGTAGGAAGTCAAC	ACGTTGGATGCTTGTATCCGGGTCATAGG	agttcTCCGGGTCATAGGAAGCTATGAT
Iplex1	G178R	ACGTTGGATGCAGGTTGTTGGAAGGAGAC	ACGTTGGATGAAGCTGTCAAGCCGTGTTT	gAGCCGTGTTCTAGATAAAAATAGTATT
Iplex2	V754M	ACGTTGGATGTCAGGTTGAGGACAGACTGC	ACGTTGGATGAGATTCTGAGCAGGAGAGG	CTGCCCTGCATCAGC
Iplex2	3737delA	ACGTTGGATGGAATGGCCAACTCTCGAAAG	ACGTTGGATGTTTGACAGTCATTTGGCCCC	CCTGAGGGCCAGATG
Iplex2	S549R	ACGTTGGATGTTCTTGAGAAGGTGGAATC	ACGTTGGATGCAGCAATGCTTGCTAGACC	gTGCTGTTGACCTCC
Iplex2	S1251N	ACGTTGGATGCTTCACTGTTCACTAGTCTC	ACGTTGGATGTTACCTTATAGGTGGGCTC	ACTGGATCAGGGAAGA
Iplex2	Y122X	ACGTTGGATGAAATGGCTGGGTAGGAG	ACGTTGGATGACAAGGAGGAACGCTCTATC	CGCTCTATCGCGATTTA
Iplex2	I336K	ACGTTGGATGTCTTCCCTATGCACTAATC	ACGTTGGATGGCGCAGAAATGCGAATG	ATGAGATGGTGGTGAAT
Iplex2	Y1014C	ACGTTGGATGTGGAGCTATAGCAGTTGTCG	ACGTTGGATGAAAGCCACTATCACTGGCAC	ACTGTTGCAACAAAGATG
Iplex2	621+3A-G	ACGTTGGATGGGAATGCAGATGAGAATAGC	ACGTTGGATGCAGAAATATATGCCATGGG	GCCTGTGCAAGGAAGTAT
Iplex2	R75X	ACGTTGGATGCCATAGAACATAAATCTCCAG	ACGTTGGATGAGAATGGGATAGAGAGCTGG	ACTCATTAATGCCCTTCGG
Iplex2	E217G	ACGTTGGATGAAACCAAGTCCACAGAAGGC	ACGTTGGATGACATTTCTGTGGATCGCTC	ggacTGGGGCTAATCTGGG
Iplex2	D1152H	ACGTTGGATGCATGAGTACATTGCACTGGG	ACGTTGGATGGATGATAAGACTTACCAAGC	gCTTACCAAGCTATCCACAT
Iplex2	S364P	ACGTTGGATGGCAGCATTATGTGACATTAC	ACGTTGGATGTTTCCCTGGGCTGTACAAAC	CTGTACAAACATGGTATGAC

Iplex2	2869insG	ACGTTGGATGCCATAGCAAGCAAAGTGTC	ACGTTGGATGCAGTGATTATCACCAGCACCC	ggggtCCAGCACCAAGTTCGT
Iplex2	4005+2T-C	ACGTTGGATGTTGCAACAGTGAGGAAAGC	ACGTTGGATGGCCTTTTTCTGGCTAAGTC	cogtGCTAAGCTCTTTTGCTC
Iplex2	W1089X	ACGTTGGATGCGGCAGCCTTACTTTGAAAC	ACGTTGGATGAACCAGCGCAGTGTGACAG	AGTGTGACAGGTACAAGAAC
Iplex2	L1065P	ACGTTGGATGTTCAAAGTAAGGCTGCCGTC	ACGTTGGATGGGCAGGAGTCCAATTTTCAC	ccCTTAAAGGACTATGGACAC
Iplex2	R709X	ACGTTGGATGGGAGTCTTTTGCACAATGG	ACGTTGGATGAACAGACTGGAGAGTTGGG	TTCTCAATCCAATCAACTCTATA
Iplex2	1078delT	ACGTTGGATGAGGCAGCCTATGTGAGATAC	ACGTTGGATGTAGTCATAGGGAAGCACAG	cogaACAGATAAAAACACCACAA
Iplex2	711+3A-G	ACGTTGGATGCTCCGCCTTTCCAGTTGTAT	ACGTTGGATGTCCTTTCCAACAACCTGAAC	AACCTGAACAAATTTGTGAAGT
Iplex2	I506V	ACGTTGGATGCTCTGGATTATGCCGTGCAC	ACGTTGGATGGCATGCTTTGATGACGCTTC	ggggTAGGAAACACCAAGATGA
Iplex2	E92K	ACGTTGGATGAGAGAGGCTGTACTGCTTTG	ACGTTGGATGGTGTGAAATTCTCAGGGTA	ccccCTGTTTTTCCCTTTTGTAG
Iplex2	S1235R	ACGTTGGATGGCAGTGTTCAAATCTACCC	ACGTTGGATGTACACAGAAGGTGAAATGC	AGAGAACATTTCCTCTCAATAAG
Iplex2	R668C	ACGTTGGATGAGGAGCATCTCCTCTAATG	ACGTTGGATGGGGATGTGATCTTTTCGACC	tcaATCCTAACTGAGACCTTACAC
Iplex2	L967S	ACGTTGGATGAAGCACCTATGTCAACCCCTC	ACGTTGGATGGATGGTGGATCAGCAGTTTC	cccaaCTAGTAAAGTACCTGCTTTC
Iplex2	R1158X	ACGTTGGATGTGTGAAATTGTCTGCCATTTC	ACGTTGGATGGAACCTAAGACTCGGCTC	ggagTAAAGACTCGGCTCACAGATC
Iplex2	DEL21kb_1	ACGTTGGATGACTCAATATACACAAGGC	ACGTTGGATGGGATACAATGAATGCTGGCT	tgTAAGATTTTGCTTTTGGCAGGGT
Iplex2	2694T-G	ACGTTGGATGAGAACATTCTACCTCTGCC	ACGTTGGATGACATGGAACACATACCTTCG	gGGAACACATACCTTCGATATATTAC
Iplex2	POLITn 7-9	ACGTTGGATGAATATCTGCAAACTCATC	ACGTTGGATGGCTTTCTCAATAATTCCCC	ccacTCCCCAAATCCCTGTTAAAAAAA
Iplex2	L997F	ACGTTGGATGACACACTTTGTCCACTTTGC	ACGTTGGATGACTGCTATAGCTCCAATCAC	cccgATAGCTCCAATCACAATTAATAA
Iplex2	935delA	ACGTTGGATGGTGAAGACTTGTGATTACC	ACGTTGGATGCCAGCAGTATGCCTTAACAG	caggATGCCTTAACAGATTGGATATTT
Iplex2	1811+1.6kbA-G	ACGTTGGATGCAGGTGTATTGATAGTAAC	ACGTTGGATGCAGAAGTACCAACAATTAC	gaatcGAGAATCTATGTACTTGAGAT
Iplex2	G576A	ACGTTGGATGCAAGAATACCTTTCAAA	ACGTTGGATGGCAGTATACAAAGATGCTGA	tATTGTATTATTAGACTCTCCTTTTG
Iplex3	S549I	ACGTTGGATGTTCTTGAGAAGGTGGAATC	ACGTTGGATGCAGCAATGCTTGCTAGACC	GCTCGTTGACCTCCA
Iplex3	R352Q	ACGTTGGATGTACCACCATCTCAATCTGC	ACGTTGGATGACCATGTTTGTACAGCCAG	GCCCAGGGAATTTGC
Iplex3	I148T	ACGTTGGATGCTGTGCAAGGAAGTATTACC	ACGTTGGATGCCTACCCAGCCATTTTTC	TTTGGCCTTCATCACA
Iplex3	F1074L	ACGTTGGATGGTACAAGAACAGTTGGCAG	ACGTTGGATGTATGGACACTTCGTGCCTTC	GGACGGCAGCCTTACTT
Iplex3	852del22	ACGTTGGATGCAAGTTATGAAATAGGTTG	ACGTTGGATGTTTCTGATAGTCTTGCCC	TTTCAGGCTGGGCTAGG
Iplex3	1540A-G	ACGTTGGATGTGAATCCTGAGCGTGATTG	ACGTTGGATGTCTGAAGGCTCCAGTTCTCC	CCAGTTCTCCCATATCA
Iplex3	3601-111G-C	ACGTTGGATGCACAATTAGTTGATGCTTCC	ACGTTGGATGGTTCATTGAAAGCCCGAC	cAGCCCGACAATAACCAA
Iplex3	A1006E	ACGTTGGATGCTCACCACATGTTTCTTTG	ACGTTGGATGTGAGGTTGTAAACTGCG	gTGTAAACTGCGACAAC
Iplex3	E60X	ACGTTGGATGCGCCGAAGGGCATTATGAG	ACGTTGGATGATGCAACTTATTGGTCCAC	TTGCAGAGAATGGGATAGA
Iplex3	DELTA508	ACGTTGGATGTATGCTGGCACCATTAAAG	ACGTTGGATGGCATGCTTTGATGACGCTTC	TTTCATAGAGAAACACCAA
Iplex3	S1045Y	ACGTTGGATGTTTCTCCAAACCTCACAGC	ACGTTGGATGGATGAGTATCGCATTAC	ACATTCACTGTACATCTTCA
Iplex3	R117H	ACGTTGGATGCCTATGACCCGGATAACAAG	ACGTTGGATGCCTCACAATAAGAGAAGGC	CCTAGATAAATCGCGATAGAG
Iplex3	3667del4	ACGTTGGATGCTTTCGAGAGTTGCCATTTC	ACGTTGGATGCTGTGAGCCGAGCTTTAAG	GAAGGTAAACCTACCAAGTCAA
Iplex3	D614G	ACGTTGGATGAATAGCTGTACCTCATGC	ACGTTGGATGACTAGGATTTTGGTCACTTC	agGGAACATTTAAAGAAAGCTG
Iplex3	2043delG	ACGTTGGATGGGTGCAAGAATCACATCCC	ACGTTGGATGGGGACATTTTCAGAACTCCA	ccTTCAGAACTCCAAATCTACA
Iplex3	R851L	ACGTTGGATGACTAAGCACCAATATGACAC	ACGTTGGATGCAGCAGTACTACATGGAAC	caagACATGGAACACATACCTTC
Iplex3	K710X	ACGTTGGATGAACAGACTGGAGAGTTTGGG	ACGTTGGATGGGGAGTCTTTGCACAATGG	gTCTTTTGCACAATGGAAATT
Iplex3	V562I	ACGTTGGATGCCAGAAATAGAGAGGAAATG	ACGTTGGATGGGTATCCAAAAGGAGAGTCTA	AATACAAATCAGCATCTTTGTATA
Iplex3	405+3A-C	ACGTTGGATGCGGCGATGTTTTTCTGGAG	ACGTTGGATGGTGATACATAATGAATGTAC	ggagGAATGTACAAATGAGATCCT
Iplex3	712-1G-T	ACGTTGGATGGTGAAGATACAATGACACC	ACGTTGGATGCCACAGAAATGTCCAATG	ccctGAAATGTGCCAATGCAAGTCC
Iplex3	N1303K	ACGTTGGATGTCACTCCACTGTTTCATAGGG	ACGTTGGATGCTTCTCTTTTCTTTTTC	TTTTTCTGGAACATTAGAAAAAA
Iplex3	S1255X	ACGTTGGATGCAAGACACACCATCGATCTG	ACGTTGGATGAGAACTGGATCAGGAAGAG	ggggCAGGGAAGAGTACTTTGTAT
Iplex3	3272-26A-G	ACGTTGGATGAGTCTTTTTCAGGTACAAG	ACGTTGGATGAAATTGGACTCCTGCCTGTG	gcgGTGAAATATTTCCATAGAAAAA
Iplex3	F316L	ACGTTGGATGAGGCAGCCTATGTGAGATAC	ACGTTGGATGTAGTCATAGGGAAGCACAG	ccctcGAAGCACAGATAAAAACACCAC
Iplex3	711+1G-T	ACGTTGGATGTCCTTTCCAACAACCTGAAC	ACGTTGGATGCTCCGCCCTTCCAGTTGTAT	CTAAAGATTAAATCAATAGGTACATA
Iplex3	1898+1G-A	ACGTTGGATGGCATGAGCATTATAAGTAAGG	ACGTTGGATGAGACTCTCCTTTTGGATACC	gTTAACAGAAAAAGAAATATTGAAAG
Iplex3	3120+1G-A	ACGTTGGATGTTTGGATGACCTTCTGCCTC	ACGTTGGATGCAGACATACTTAACGGTACT	ccTACTTAACGGTACTTATTTTACATA
Iplex3	Q30X	ACGTTGGATGGGACACACCAATTTTGAGG	ACGTTGGATGCAGCAGAATCAACAGAAGGG	tgggATATGTCTGACAATCCAGGCGCT
Iplex4	L206W	ACGTTGGATGAACAATCCCAGATTAGCCC	ACGTTGGATGCATTGGCACATTTCTGTGG	TGTGGATCGCTCCTT
Iplex4	W57G	ACGTTGGATGGCACATGCAACTTATTGGTC	ACGTTGGATGTTTCTTTGAAGCCAGCTCTC	GCCAGCTCTCTATCCC
Iplex4	G480C	ACGTTGGATGAATGTTGCCAGGCATAATCC	ACGTTGGATGGATTATGGGAGAACTGGAGC	AACTGGAGCCTTCAGAG
Iplex4	E692X	ACGTTGGATGTAGAAGGAGATGCTCCTGTC	ACGTTGGATGGAATCTCCTTTTTTCCC	TCCTTTTTTCCCCAACT

Iplex4	4382delA	ACGTTGGATGCCAGATCTCACTAACAGC	ACGTTGGATGGCAGTTTCTGGATGGAATCG	TGCCGCACCTTTGTCTCT
Iplex4	4005+1G-A	ACGTTGGATGTTGCAACAGTGGAGGAAAGC	ACGTTGGATGGCCTTTTTCTGGCTAAGTC	GCTAAGTCCTTTTGTCTCA
Iplex4	R1066C	ACGTTGGATGGGCGAGTCCAATTTTCAC	ACGTTGGATGTTCAAAGTAAGGCTGCCGTC	ggcgGCCGTCCGAAGGCAC
Iplex4	3659delC	ACGTTGGATGCTGTGAGCCGAGTCTTTAAG	ACGTTGGATGCTTTCGAGAGTTGGCCATTG	GTATGGTTTGGTTGACTTG
Iplex4	1154insTC	ACGTTGGATGTGTACAGCCAGGGAATG	ACGTTGGATGCTCCGGAATATTCACCAC	cAAAAATTCACCACCATCTC
Iplex4	DELTA1507	ACGTTGGATGGCATGCTTTGATGACGCTTC	ACGTTGGATGTATGCCTGGCACCATTAAAG	GGCACCATTAAAGAAAAATATC
Iplex4	G551S	ACGTTGGATGGAGAAGGTGGAATCACACTG	ACGTTGGATGCAGCAATGCTTGCTAGACC	ccagcAATTCTTGCTCGTTGAC
Iplex4	M952I	ACGTTGGATGTCTACCACTGGTGCACTCTC	ACGTTGGATGAGGGTTGACATAGGTGCTTG	tTGCTTGAAGAACAGAATGTAA
Iplex4	1342-2A-C	ACGTTGGATGAATATCTGACAACTCATC	ACGTTGGATGGCTTCTCAAATAATTCCCC	ccctAAATAATTCCTCAATATCCC
Iplex4	406-1G-A	ACGTTGGATGAGAGAGGCTGACTGCTTTG	ACGTTGGATGGTGTGAATTTCTCAGGGTA	aacgCTGTTTTTCCCTTTTGTA
Iplex4	G314E	ACGTTGGATGAGGCACGCTATGTGAGATAC	ACGTTGGATGTAGTCATAGGAAGCACAG	CAGATAAAAAACCCACAAAGAAC
Iplex4	M595I	ACGTTGGATGTATCTAAAGCTGTGCTCG	ACGTTGGATGGTTCATTTTAGAAGTGACC	gcCCTAAATCCTAGTTTGTAGC
Iplex4	1288insTA	ACGTTGGATGGGATTTCTTACAAAAGCAAG	ACGTTGGATGCCAGAAGGCTTTACATTG	ggACTTCTGTAGTCGTTAAGTTAT
Iplex4	M1101K	ACGTTGGATGCTTGACCTGTCAACACTGC	ACGTTGGATGTGAAGGTAAACGAATGAAG	GATGACAAAAATCATTTCTTACTTC
Iplex4	A561E	ACGTTGGATGCCAGGAATAGAGAGGAAATG	ACGTTGGATGGGTATCCAAAAGGAGAGTCTA	ccccCAATCAGCATCTTTGTATACT
Iplex4	711+5G-A	ACGTTGGATGCTCTTCCAACAACCTGAAC	ACGTTGGATGCTCCGCTTTCCAGTTGTAT	TGCCCTAAAGATTAAATCAATAGGTA
Iplex4	1717-1G-A	ACGTTGGATGGTATTCCACCTTCTCCAAG	ACGTTGGATGGCATACTAAAAGTACTCTC	CTCTCTAATTTCTATTTTGGTAATA
Iplex4	G85E	ACGTTGGATGATTAATGCCCTTCGGCGATG	ACGTTGGATGACAAATGAGATCCTTACCCC	GATCCTTACCCCTAAATATAAAAAAGATT
Iplex4	W846X	ACGTTGGATGAATTAAGCTCTTGTGACAG	ACGTTGGATGGATATGGAGACATACCAGC	ctttdAGCATACCAGCAGTGACTACATG
Iplex4	3905insT	ACGTTGGATGCAAGACACACCATCGATCTG	ACGTTGGATGAGAAGTGGATCAGGGAAGAG	gggcGAGTACTTTGTATCAGCTTTTTT
Iplex5	S549N	ACGTTGGATGTTCTTGGAGAAGGTGGAATC	ACGTTGGATGCAGCAATGCTTGCTAGACC	GCTCGTTGACCTCCA
Iplex5	T351S	ACGTTGGATGTACCACCATCTCATTCTGC	ACGTTGGATGACCATGTTTGTACAGCCCAG	CAGGGAATTTGCCGA
Iplex5	G1244E	ACGTTGGATGGTCACAGAAGTATCCCATC	ACGTTGGATGAAAGTACTCTTCCCTGATCC	TCCCTGATCCAGTTCTT
Iplex5	H199Y	ACGTTGGATGGGAAGATACAATGACACCTG	ACGTTGGATGCTTGCAAGGAGCGATCCAC	gGCGATCCACACGAAAT
Iplex5	V232D	ACGTTGGATGATCTGGGAGTTGTTACAGGC	ACGTTGGATGATCATCATTCTCCCTAGCCC	aCTGAAAAAGGGCAAGG
Iplex5	1609delCA	ACGTTGGATGGATTATGGGAGAAGTGGAGC	ACGTTGGATGAATGGTCCAGGCATAATCC	GGCATAATCCAGGAAAC
Iplex5	3821delT	ACGTTGGATGTACACAGAAGGTGGAATGC	ACGTTGGATGGCAGTGTTCAAATCTCACCC	AGGACTTATTGAGAAGGAA
Iplex5	991del5	ACGTTGGATGACTGCTGGGAAGAGCAATG	ACGTTGGATGAAGGACAGAATTAATAAC	TTGGAACAACCTACTGTCTT
Iplex5	R117C	ACGTTGGATGCCCTACAATAAGAGAAGGC	ACGTTGGATGCCATGACCCGGATAACAAG	gggCGGATAACAAGAGGAA
Iplex5	L1065R	ACGTTGGATGTTCAAAGTAAGGCTGCCGTC	ACGTTGGATGGGCGAGAGTCCAATTTTAC	GCTTAAAGGACTATGGACAC
Iplex5	2176insC	ACGTTGGATGTTTCCCAAACTCTCCAGTC	ACGTTGGATGTAGAAGGAGATGCTCCTGTC	ccCTGTCTCTCGGACAGAAAC
Iplex5	W1282X	ACGTTGGATGCTGTGGTATCACTCCAAGG	ACGTTGGATGATCCAGATCGATGGTGTGTC	cTTCAATAACTTTGCAACAGTG
Iplex5	G576X	ACGTTGGATGGCAGTATACAAAGATGCTGA	ACGTTGGATGCAAGAACATACCTTTCAA	TTCTGTTAAACATCTAGGTATC
Iplex5	936delTA	ACGTTGGATGCCAGCAGTATGCTTAACAG	ACGTTGGATGGTGAAGACTTGTGATTACC	gTACCTCAGAAATGATTGAAAT
Iplex5	621+1G-T	ACGTTGGATGGGAATGCAGATGAGAATAGC	ACGTTGGATGCAGAATATATGTCATGGG	gggtCCTGTGCAAGGAAGTATTA
Iplex5	2603delT	ACGTTGGATGGGTTATCTCAAGAACTGGC	ACGTTGGATGCCCAAGCGATGTATACCTAC	CCTACCTTTAAGTCTTCTTCGTTA
Iplex5	R1162X	ACGTTGGATGTTACCTTCTGTTGGCATGTC	ACGTTGGATGGTCTGCCATTCTTAAAC	ggatgTCAGATGCGATCTGTGAGC
Iplex5	4016insT	ACGTTGGATGCTTCTTCTTTCTTTTTCG	ACGTTGGATGCTCACTCCACTGTCATAGGG	TTTTTCTAAATGTTCCAGAAAAA
Iplex5	I507V	ACGTTGGATGTATGCCTGGCACCATTAAAG	ACGTTGGATGGCATGCTTTGATGACGCTTC	agatgCATCATAGGAACACCAAGA
Iplex5	R851X	ACGTTGGATGCAGCAGTACTACATGGAAC	ACGTTGGATGACTAAGCACCATAATAGCAC	ctcatCTCTGTGGACAGTAATATATC
Iplex5	711+3A-T	ACGTTGGATGCTCTTCCAACAACCTGAAC	ACGTTGGATGCTCCGCTTTCCAGTTGTAT	GCCTAAAGATTAAATCAATAGGTACA
Iplex5	G622D	ACGTTGGATGTGGAGTTCTGAAAAATGCCC	ACGTTGGATGGGTCACTTCTAAATGGAAC	gggtACAAAAATTAATTTTGCATGAAG
Iplex6	Q1281X	ACGTTGGATGATCCAGATCGATGGTGTGTC	ACGTTGGATGCTGTGGTATCACTCCAAGG	AGGCTTCTCCTCACT
Iplex6	R1070Q	ACGTTGGATGCAGAGCTTTGTGGAACAGAG	ACGTTGGATGAAAGGACTATGGACACTTCG	TTGCTGCTCTCGGAC
Iplex6	R347H	ACGTTGGATGTACCACCATCTCATTCTGC	ACGTTGGATGACCATGTTTGTACAGCCCAG	aCGAGTGACCCCATG
Iplex6	F508C	ACGTTGGATGTATGCCTGGCACCATTAAAG	ACGTTGGATGGCATGCTTTGATGACGCTTC	TCATCATAGGAACACCA
Iplex6	DEL21kb_2	ACGTTGGATGTTGTGAGATCTGCTGTATC	ACGTTGGATGAGATTTTGTCTTTGGCAGGG	CTTTTGGCAGGGTAAAG
Iplex6	1812-1G-A	ACGTTGGATGCCAGGAATAGAGAGGAAATG	ACGTTGGATGGGTATCCAAAAGGAGAGTCTA	AGCATCTTTGTATAGTCT
Iplex6	G673X	ACGTTGGATGTTTCCCAAACTCTCCAGTC	ACGTTGGATGCTGAGACCTTACACCGTTTC	TACACCGTTTCTCATTAGAA
Iplex6	DELTA311	ACGTTGGATGACACCACAAGAACCTGAG	ACGTTGGATGACTGAAAGTACTCGGAAGG	TCAATAGCTCAGCCTTCTTCT
Iplex6	E588V	ACGTTGGATGAGACTCTCTTTTGGATACC	ACGTTGGATGGCATGAGCATTATAAGTAAGG	GGTATTCAAAGACATACCTT
Iplex6	Q493X	ACGTTGGATGGATTATGGGAGAAGTGGAGC	ACGTTGGATGAATGGTCCAGGCATAATCC	gaAGGCATAATCCAGGAAACT

Iplex6	R75Q	ACGTTGGATGTCCTAAACTCATTAAATGCC	ACGTTGGATGACAAATGAGATCCTTACCCC	ACATAAATCTCCAGAAAAACAT
Iplex6	G542A	ACGTTGGATGATTCTTGCTCGTTGACCTCC	ACGTTGGATGGGACATCTCCAAGTTTGAC	AGAGAAAGACAATATAGTTCTTG
Iplex6	Y1381X	ACGTTGGATGGTTCTGTGATATTATGTGG	ACGTTGGATGGTGCAATCAGCAATGCTTG	TGTTTTAGAGTCTCTAATTATTTG
Iplex7	R74W	ACGTTGGATGAGAATGGGATAGAGAGCTGG	ACGTTGGATGCCATAGAACATAAATCTCCAG	CCAGAAAAACATCGCC
Iplex7	POLITn 5-7	ACGTTGGATGAATATCTGACAAACTCATC	ACGTTGGATGGCTTTCTCAAATAATCCCC	CCCAATCCCTGTTAAAAA
Iplex7	R347P	ACGTTGGATGTCACCACTCTCATTCTGC	ACGTTGGATGACCATGTTGTACAGCCCAG	TTGCCGAGTGACCGCCATG
Iplex7	2183AA-G	ACGTTGGATGTTTCCCCAACTCTCCAGTC	ACGTTGGATGTAGAAGGAGATGCTCCTGTC	TCTCCTGGACAGAAAAA
Iplex7	R553X	ACGTTGGATGGAAGTGGAATCACACTGAG	ACGTTGGATGCAGCAATGCTTGCTAGACC	ccgTGCTAAAGAAATCTTGCTC
Iplex7	E585X	ACGTTGGATGGCATGAGCATTATAAGTAAGG	ACGTTGGATGAGACTCTCCTTTTGATACC	ACCTAGATGTTTTAACAGAAAAA
Iplex8	G542X	ACGTTGGATGGGACATCTCAAGTTTGAC	ACGTTGGATGATTCTTGCTCGTTGACCTCC	TGTGATCCACCTTCTC
Iplex8	2184delA	ACGTTGGATGTTTCCCCAACTCTCCAGTC	ACGTTGGATGTAGAAGGAGATGCTCCTGTC	CCTGGACAGAAAAA
Iplex8	R334W	ACGTTGGATGTGAGAATGAGATGGTGGTG	ACGTTGGATGTCTCAGGGTTCTTTGTGGTG	CTAATCAAGGAATCATCCTC
Iplex8	394delTT	ACGTTGGATGACAAATGAGATCCTTACCCC	ACGTTGGATGATTAATGCCCTTCGGCGATG	AGATTTATGTTCTATGGAATCTTT
Iplex9	Q1100P	ACGTTGGATGTGAAGTAACAGCAATGAAG	ACGTTGGATGCTTGACCTGTCAACACTGC	AACACTGCGCTGGTTCC
Iplex9	R1066H	ACGTTGGATGTTCAAAGTAAGGCTGCCGTC	ACGTTGGATGGGAGGAGTCCAATTTTAC	AAAGGACTATGGACACTTC
Iplex9	2184insA	ACGTTGGATGTTTCCCCAACTCTCCAGTC	ACGTTGGATGTAGAAGGAGATGCTCCTGTC	CCTGGACAGAAAAA
Iplex9	R334Q	ACGTTGGATGTCTCAGGGTTCTTTGTGGTG	ACGTTGGATGTGAGAATGAGATGGTGGTG	AGATGGTGGTGAATTTTC
Iplex9	387delA	ACGTTGGATGTTACCTTATAGTGGGCTC	ACGTTGGATGCTTCAGTGTTCACTAGTCTC	TGATAACAAAGTACTCTTCCC
Iplex9	G85V	ACGTTGGATGACAAATGAGATCCTTACCCC	ACGTTGGATGATTAATGCCCTTCGGCGATG	TTCTGGAGATTTATGTTCTATG
Iplex9	T582R	ACGTTGGATGAGACTCTCCTTTTGATACC	ACGTTGGATGGCATGAGCATTATAAGTAAGG	ACCTTTCAAATATTCTTTTTCT
Iplex9	I502T	ACGTTGGATGGTTTTCTGGATTATGCCTG	ACGTTGGATGGCATGCTTTGATGACGCTTC	CACCAAAGATGATTTTTCTTTA
Iplex9	A559T	ACGTTGGATGCAGCAATGCTTGCTAGACC	ACGTTGGATGAATCACACTGAGTGGAGGTC	ggtaACGAGCAAGAATTTCTTTA
Iplex10	R560T	ACGTTGGATGCAGCAATGCTTGCTAGACC	ACGTTGGATGAATCACACTGAGTGGAGGTC	AGCAAGAAATTTCTTTAGCAA
Iplex10	V520F	ACGTTGGATGCTTACCTCTCTAGTTGGC	ACGTTGGATGTATGCCTGGCACCATTAAAG	ATGATGAATATAGATACAGAAGC
Iplex10	1898+5G-T	ACGTTGGATGGCATGAGCATTATAAGTAAGG	ACGTTGGATGAGACTCTCCTTTTGATACC	AGAAAAAGAAATTTTGAAAGGTAT
Iplex11	Q552X	ACGTTGGATGGAAGTGGAATCACACTGAG	ACGTTGGATGCAGCAATGCTTGCTAGACC	AAAGAAATCTTGCTCGTT
Iplex11	1898+3A-G	ACGTTGGATGGCATGAGCATTATAAGTAAGG	ACGTTGGATGAGACTCTCCTTTTGATACC	AGAAAAAGAAATTTTGAAAGGT
Iplex12	L571S	ACGTTGGATGCCATTTCTTTTAGAGCAG	ACGTTGGATGACATCTAGGTATCCAAAAGG	GTATCCAAAAGGAGAGTCT
Iplex12	L558S	ACGTTGGATGAATCACACTGAGTGGAGGTC	ACGTTGGATGCAGCAATGCTTGCTAGACC	AATTAGTTATTCACCTTGCT

ANEXO III.- EVOLUCIÓN EN LA COBERTURA DE LOS CHIPS.

CHIP-CFTRv2006	CHIP-CFTRv2007	CHIP-CFTRv2008 (en pruebas)
		
1078delT	1078delT	1001+11C-T
1609delCA	1154insTC	1078delT
1716G/A	1288insTA	1154insTC
1717-1A	1540A/G	1259insA
1717-8G-A	1609delCA	1288insTA
1811+1.6kbA-G	1677delTA	1342-2A-C
1812-1G-A	1716G/A	1540A/G
1898+1A	1717-1G-A	1609delCA
1898+3A-G	1717-8G-A	1677delTA
2143delT	1811+1.6kbA-G	1716G/A
2183AA-G	1812-1G-A	1717-1G-A
2184delA	1898+1G-A	1717-8G-A
2184insA	1898+3A-G	1811+1.6kbA-G
2603delT	1898+5G-T	1812-1G-A
2789+5G-A	2043delG	1898+1G-A
2869insG	2055del9-A	1898+3A-G
3120+1A	2143delT	1898+5G-T
3199del6	2176insC	2043delG
3272-26A-G	2183AA-G	2055del9-A
3601-111G-C	2184delA	2143delT
3659delC	2184insA	2176insC
3667del4	2307insA	2183AA-G
3849+10KbC-T	2603delT	2184delA
3849+4G	2694T/G	2184insA
3860ins31	2789+5G-A	2307insA
3876delA	2869insG	2603delT
3905insT	3120+1G-A	2694T/G
4005+1G-A	3199del6	2789+5G-A
405+1A	3272-26A-G	2869insG
405+3C	3601-111G-C	3120+1G-A
621+1G-T	3659delC	3199del6
711+1G-T	3667del4	3272-26A-G
711+3A-T	3737delA	3601-111G-C
711+5G-A	3821delT	3659delC
712-1G-T	3849+10KbC-T	3667del4
875+1G-A	3849+4A-G	3737delA
936delTA	3860ins31	3821delT

A1006E	3876delA	3849+10KbC-T
A120T	3905insT	3849+4A-G
A559T	394delTT	3860ins31
A561E	4005+1G-A	3876delA
D1152H	4005+2T-C	3905insT
D1270N	4016insT	394delTT
DELE 2,3(21kb)	405+1G-A	4005+1G-A
DELTA508	405+3A-C	4005+2T-C
DELTA507	406-1G-A	4016insT
E585X	4382delA	405+1G-A
E60X	444delA	405+3A-C
E692X	4521G/A	406-1G-A
E92K	621+1G-T	4382delA
F1052V	621+3A-G	444delA
F1074L	711+1G-T	4521G/A
F316L	711+3A-G	621+1G-T
F508C	711+3A-T	621+3A-G
G1244E	711+5G-A	711+1G-T
G178R	712-1G-T	711+3A-G
G314E	852del22	711+3A-T
G480C	875+1G-A	711+5G-A
G542A	935delA	712-1G-T
G542X	936delTA	852del22
G551D	991del5	875+1G-A
G576A	A1006E	935delA
G673X	A120T	936delTA
G85V	A455E	991del5
H199Y	A559T	A1006E
I148T	A561E	A107V
I807M	D1152H	A120T
K710X	D1270N	A455E
L1065R	D614G	A559T
L159S	DELE 2,3(21kb)	A561E
L206W	DELTA508	D1152H
L558S	DELTA507	D1270N
L571S	E217G	D443Y
L967S	E585X	D579G
L997F	E588V	D614G
M1101K	E60X	DELE 2,3(21kb)
M952I	E692X	DELTA508
N1303K	E92K	DELTA507
P205S	F1052V	E217G
P5L	F1074L	E585X
Q1100P	F316L	E588V
Q1281X	F508C	E60X
Q1313X	G1244E	E692X
Q30X		

Q493X	G178R	E92K
Q552X	G314E	F1052V
Q890X	G330X	F1074L
R1066C	G480C	F316L
R1158X	G542A	F508C
R1162X	G542X	G1069R
R117C	G551D	G1244E
R117H	G551S	G1349D
R334W	G576A	G178R
R347H	G576X	G314E
R347P	G622D	G330X
R352Q	G673X	G480C
R553X	G85E	G542A
R560T	G85V	G542X
R668C	H199Y	G551D
R709X	I148T	G551S
R74W	I336K	G576A
R75Q	I502T	G576X
R851X	I506V	G622D
S1045Y	I507V	G673X
S1235R	I807M	G85E
S1251N	K710X	G85V
S42F	L1065P	H199Y
S549N	L1065R	I148T
S549R	L159S	I336K
T351S	L206W	I502T
V232D	L558S	I506V
V520F	L571S	I507V
V754M	L967S	I807M
W1089X	L997F	K710X
W1282X	M1101K	L1065P
Y1014C	M595I	L1065R
Y1092X	M952I	L159S
Y122X	N1303K	L206W
Y1381X	P205S	L558S
	P5L	L571S
	P67L	L967S
	Q1100P	L997F
	Q1281X	M1101K
	Q1313X	M595I
	Q30X	M952I
	Q493X	N1303K
	Q552X	P205S
	Q890X	P5L
	R1066C	P67L
	R1066H	Q1100P
	R1070Q	Q1281X

	R1158X	Q1313X
	R1162X	Q30X
	R117C	Q493X
	R117H	Q552X
	R334Q	Q890X
	R334W	R1066C
	R347H	R1066H
	R347P	R1070Q
	R352Q	R1158X
	R553X	R1162X
	R560T	R117C
	R668C	R117H
	R709X	R334Q
	R74W	R334W
	R75Q	R347H
	R75X	R347P
	R851L	R352Q
	R851X	R553X
	S1045Y	R560T
	S1196X	R668C
	S1235R	R709X
	S1251N	R74W
	S1255X	R75Q
	S364P	R75X
	S42F	R851L
	S549I	R851X
	S549N	S1045Y
	S549R	S1196X
	T351S	S1235R
	T582R	S1251N
	Tn 5/7/9	S1255X
	V232D	S364P
	V520F	S42F
	V562I	S549I
	V754M	S549N
	W1089X	S549R
	W1282X	T338I
	W57G	T351S
	W846X	T582R
	Y1014C	Tn 5/7/9
	Y1092X	V232D
	Y122X	V520F
	Y1381X	V562I
	Y913C	V754M
		W1089X
		W1282X
		W57G

		W846X
		Y1014C
		Y1092X
		Y122X
		Y1381X
		Y913C
TOTAL: 119	TOTAL: 175	TOTAL: 184





BIBLIOGRAFÍA

VII.1.- BIBLIOGRAFÍA

Abman SH, Ogle J, Horbeck R, Butler-Simon N, Hammond K, Accurso F. Early bacteriological, immunologic and clinical courses of young infants with cystic fibrosis identified by neonatal screening. *J Pediatr* 1991; 119:211-7.

Alonso MJ, Heine-Suñer D, Calvo M, Rosell J, Giménez J, Ramos MD, Telleria JJ, Palacio A, Estivill X, Casals T. Spectrum of mutations in the CFTR gene in cystic fibrosis patients of Spanish ancestry. *Ann Hum Genet* 2007 ;71: 194-201.

Allen FH, Jr., Dooley RR, Shwachman H, Steinberg AG. Linkage studies with cystic fibrosis of the pancreas. *Am J Hum Genet* 1956; 8:162-76.

Anderson DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relationship to celiac disease: Clinical and pathologic study. *Am J Dis Chil* 1938; 56:344-399.

Anderson DH, Hodges RG. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology. *Am J Dis Child* 1946; 72: 62.

Anderson MP, Berger HA, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell* 67:775-84 (1991A).

Anderson MP, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* 1991; 251:679-682 (1991B).

Antonarakis SE. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. Nomenclature Working Group. *Hum Mutat* 1998; 11:1-3.

Arkwright PD, Laurie S, Super M, Pravica V, Schwarz MJ, Webb AK. TGF-beta(1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. *Thorax* 2000;55:459– 62.

Arkwright PD, Pravica V, Geraghty PJ, Super M, Webb AK, Schwarz M, *et al.* End-organ dysfunction in cystic fibrosis: association with angiotensin I converting enzyme and cytokine gene polymorphisms. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:384– 9.

Armstrong DS; Gimwood K, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Phelan PD: Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. *BMJ* 1995; 320: 1571.

Aron Y, Polla BS, Bienvenu T, Dall'ava J, Dusser D, Hubert D. HLA class II polymorphism in cystic fibrosis. A possible modifier of pulmonary phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159: 1464– 8.

Baroni MA, Anderson YE, Mischler E: Cystic fibrosis newborn screening: impact of early screening results on parenting stress. *Pediatr Nurs* 1997; 23: 143.

Bedrossian CWM, Greenberg SC, Singer DB, Hansen J, Rosenberg H. The lung in CF: a quantitative study including prevalence of pathologic findings among different age groups. *Human Pathol* 1976; 7:195– 204.

Blaisdell CJ, Howard TD, Stern A, Bamford P, Bleecker ER, Stine OC. CLC-2 single nucleotide polymorphisms (SNPs) as potential modifiers of cystic fibrosis disease severity. *BMC Med Genet* 2004;5:26

Blau H, Mussaffi H, Prais D, Mei-Zahav M. Cystic fibrosis mutations with widely variable phenotype: the D1152H example. *Pediatr Pulmonol.* 2006 Mar; 41(3):250-254.

- Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002 Jun; 19(6):575-606.
- Bocker, S . SNP and mutation Discovery using base-specific cleavage and MALDI-TOF mass spectrometry. *Bioinformatics* 2003; 19 (Suppl 1) I44-I53.
- Bois E, Feingold J, Demenais F, Runavot Y, Jehanne M, Toudic L. Cluster of cystic fibrosis cases in a limited area of Brittany (France). *Clin Genet* 1978; 14: 73.
- Bossi A, Battistini F, Braggion C, Magno EC, Cosimi A, de Candussio G, Gagliardini R, Giglio L, Giunta A, Grzincich GL, La Rosa M, Lombardo M, Lucidi V, Manca A, Mastella G, Moretti P, Padoan R, Pardo F, Quattrucci S, Raia V, Romano L, Salvatore D, Taccetti G, Zanda M. [Italian Cystic Fibrosis Registry: 10 years of activity]. *Epidemiol Prev* 1999; 23:5-16.
- Bowler IM, Estlin EJ, Littlewood JM. Cystic fibrosis in Asians. *Arch Dis Child* 1993; 68:120-2.
- Bronstein MN, Sokol RJ, Absman SH, Chatfield BA, Hammond KB, Hambidge KM, Stall CD, Accurso FJ: Pancreatic insufficiency, growth, and nutrition in infants identified by newborn screening as having cystic fibrosis. *J Pediatr* 1992;120: 533.
- Buscher R, Eilmes KJ, Grasemann H, Torres B, Knauer N, Sroka K, *et al.* Beta2 adrenoceptor gene polymorphisms in cystic fibrosis lung disease. *Pharmacogenetics* 2002; 12:347– 53.
- Bush A, Alton EFWF, Davies JC, Griesenbach U, Jaffe A (eds): Cystic Fibrosis in the 21st Century. *Prog Respir Res* 2006; vol 34. Karger.

- Carrington M, Krueger LJ, Holsclaw Jr DS, Iannuzzi MC, Dean , Mann D. Cystic fibrosis-related diabetes is associated with HLA DQB1 alleles encoding Asp-57-molecules. *J Clin Immunol* 1994; 14:353– 8.
- Casals T, Ramos MD, Gimenez J, Larriba S, Nunes V, Estivill X. High heterogeneity for cystic fibrosis in Spanish families: 75 mutations account for 90% of chromosomes. *Hum Genet* 1997; 101: 365-370.
- Cashman SM, Patino A, Delgado MG, Byrne L, Denham B, De Arce M. The Irish cystic fibrosis database. *J Med Genet* 1995; 32:972-5.
- Castellani C, Bonizzato A, Cabrini G, Mastella G: Newborn screening strategy for cystic fibrosis: A field study in an area with high allelic heterogeneity. *Acta Pediatr* 1997; 86: 497.
- Castellani C, Picci L, Scarpa M, Dechecchi MC, Zanolla L, Assael BM, Zacchello F. Cystic fibrosis carriers have higher neonatal immunoreactive trypsinogen values than non-carriers. *Am J Med Genet A* 2005 ;135(2):142-4.
- CFGAC: The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Population variation of common cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat* 1994; 4:167-77.
- CFGAC: The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. *N Engl J Med* 1993; 329:1308-13.
- Chao AC, de Sauvage FJ, Dong YJ, Wagner JA, Goeddel DV, Gardner P. Activation of intestinal CFTR Cl⁻ channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *Embo J* 1994; 13:1065-72.

- Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR, Smith AE. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 1990; 63:827-34.
- Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* 1991; 66:1027-36.
- Chevalier-Post F, Chomel JC, Hillaire D, Kitzis A, Kaplan JC, Goutaland R, Mathieu M: A nonsense mutation in exon 4 of the cystic fibrosis gene frequent among the population of the Reunion Island. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 647.
- Choi JY, Muallem D, Kiselyov K, Lee MG, Thomas PJ, Muallem S. Aberrant CFTR-dependent HCO₃⁻ transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature* 2001; 410:94-7.
- Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nat Genet* 1993; 3:151-6.
- Claustres M, Guittard C, Bozon D, Chevalier F, Verlingue C, Ferec C, Girodon E, Cazeneuve C, Bienvenu T, Lalau G, Dumur V, Feldmann D, Bieth E, Blayau M, *et al.* Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France. *Hum Mutat* 2000, 16: 143-156.
- Conneally PM, Merritt AD, Yu PL . Cystic fibrosis: population genetics. *Tex Rep Biol Med* 1973; 31:639-50.
- Crawford I, Maloney P, Zeitlin PL *et al.* Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9262-9266.

Crossley JR, Smith PA, Edgar BW, Gluckman PK, Elliott RB. Neonatal screening for cystic fibrosis, using immunoreactive trypsin assay in dried blood spots. Clin Chim Acta 1981;113:111-21.

Cuthbert AW, Halstead J, Ratcliff R, Colledge WH, Evans MJ: The genetic advantage hypothesis in cystic fibrosis heterozygotes: A murine study. J Physiol 1995; 482: 449.

Cutting GR. Splicing of the CFTR gene. In Dodge JA, Brock DJH, Widdicombe JH (eds): Current topics in Cystic Fibrosis, Vol II. Wiley, Chichester, pp. 55-74.1994.

Cutting GR, Curristin SM, Nash E, Rosenstein BJ, Lerer I, Abeliovich D, Hill A, Graham C: Analysis of four diverse population groups indicates that a subset of cystic fibrosis mutations occur in common among Caucasians. Am J Hum Genet 1992; 50: 1185.

Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry 2001. Annual Report. Bethesda, Maryland.

Cystic Fibrosis Analysis Consortium. Worldwide survey of the delta F508 mutation--report from the cystic fibrosis genetic analysis consortium. Am J Hum Genet 1990; 47:354-9.

Davies JC, Turner MW, Klein N. Impaired pulmonary status in cystic fibrosis adults with two mutated MBL-2 alleles. Eur Respir J 2004; 24:798-804.

Davis PB, Drumm M, Konstan MW: Cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 1996; 154: 1229.

De Semir Frappart, David. Reparación de mutaciones en el gen CFTR como estrategia de terapia génica para la fibrosis quística. Memoria de tesis (2005):www.tesisenxarxa.net/TESIS_UPF/AVAILABLE/TDX-0721105-113739/tdds1de1.pdf

- den Dunnen JT, Antonarakis E. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 2001; 109: 121-124.
- Denning CR, Sommers SC, Quigley HJ, Jr. Infertility in male patients with cystic fibrosis. *Pediatrics* 1968; 41:7-17.
- Devaney J, Maher M, Smith T, Houghton JA, Glennon M. HFE alleles in an Irish cystic fibrosis population. *Genet Test* 2003; 7:155 – 8.
- Devoto M, Castagnola S, Saha N, Chetsanga C, Allen M, Gyllensten U, Romeo G. Screening for the major cystic fibrosis mutation in non-Caucasian populations. *Am J Hum Genet* 1991; 49:903-4.
- Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 1953; 12:549-63.
- Doring G, Krogh-Johansen H, Weidinger S, Hoiby N. Allotypes of alpha 1-antitrypsin in patients with cystic fibrosis, homozygous and heterozygous for $\Delta F508$. *Pediatr Pulmonol* 1994;18:3– 7.
- Duthie A, Doherty DG, Donaldson PT, Scott-Jupp R, Tanner MS, Eddleston AL. The major histocompatibility complex influences the development of chronic liver disease in male children and young adults with cystic fibrosis. *J Hepatol* 1995; 23:532–7.
- Elborn JS, Shale DJ, Britton JR. Cystic fibrosis: current survival and population estimates to the year 2000. *Thorax* 1991; 46:881-5.
- Ellsworth RE, Jamison DC, Touchman JW. Comparative genomic sequence analysis of the human and mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:1172-1177.

Estivill X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat* 1997; 10(2): 135-154.

Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C. Das coeliakies syndrom be: Angeborener zystischer pankreas fibromatose und bronkiektasien. *Wien Med Wochenschr* 1936; 86:753-756.

Farber D. Pancreatic function and disease in early life. *Arch Path* 1944; 37:328.

Farrell PM, Kosciak RE. Sweat chloride concentrations in infants homozygous or heterozygous for $\Delta F508$. *Pediatrics* 1996; 97(4):524-8.

Farrell PM, Lai HJ, Li Z, Kosorok MR, Laxova A, Green CG, Collins J, Hoffman G, Laessig R, Rock MJ, Splaingard ML. Evidence on improved outcomes with early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal creening: enough is enough!. *J Pediatr* 2005 ; 147:S30-6.

Farrell PM, Shen G, Splaingard M, *et al*. Acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *Pediatrics* 1997; 100: E2.

Farrell PM, Kosorok MR, Laxova A, *et al* for the Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. Nutritional benefits of neonatal screening for cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1997; 337: 963-69.

Farrell PM, Kosorok MR, Rock MJ, *et al*. Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves long-term growth. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. *Pediatrics* 2001; 107: 1-13.

Farrell PM, Li Z, Kosorok MR, Laxova A, Green CG, Collins J, *et al*. Bronchopulmonary disease in children with cystic fibrosis after early or delayed diagnosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:1100-8.

- Farrell PM, Li Z, Kosorok MR, et al. Longitudinal evaluation of bronchopulmonary disease in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2003; 36:1–11. (2003b)
- Farrell PM. Is newborn screening for cystic fibrosis a basic human right? *J Cyst Fibros*. 2008 Feb 8.
- FitzSimmons SC. The changing epidemiology of cystic fibrosis. *J Pediatr* 1993; 122:1–9.
- Flamant C, Henrion-Caude A, Boelle PY, Bremont F, Brouard J, Delaisi B, et al. Glutathione-S-transferase M1, M3, P1 and T1 polymorphisms and severity of lung disease in children with cystic fibrosis. *Pharmacogenetics* 2004;14:295–301.
- Frangolias DD, Ruan J, Wilcox PJ, Davidson AG, Wong LT, Berthiaume Y, et al. Alpha 1-antitrypsin deficiency alleles in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 390– 6.
- Gabolde M, Guilloud-Bataille M, Feingold J, Besmond C. Association of variant alleles of mannose binding lectin with severity of pulmonary disease in cystic fibrosis: cohort study. *BMJ* 1999; 319:1166– 7.
- Gabolde M, Hubert D, Guilloud-Bataille M, Lenaerts C, Feingold J, Besmond C. The mannose binding lectin gene influences the severity of chronic liver disease in cystic fibrosis. *J Med Genet* 2001; 38: 310– 1.
- Gabriel SE, Brigman KN, Koller BH, Boucher RC, Stutts MJ. Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science* 1994; 266:107-9.
- Garred P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Hoiby N, et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1999;104:431– 7.

Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959; 23:545-9.

Giglio L, Candusso M, D'Orazio C, Mastella G, Faraguna D: Failure to thrive: The earliest feature of cystic fibrosis in infants diagnosed by neonatal screening. *Acta Paediatr* 1997; 86: 1162.

Goss CH, Rubenfeld GD, Otto K, Aitken ML. The effect of pregnancy on survival in women with cystic fibrosis. *Chest* 2003; 124:1460-8.

Grasemann H, Knauer N, Buscher R, Hubner K, Drazen JM, Ratjen F. Airway nitric oxide levels in cystic fibrosis patients are related to a polymorphism in the neuronal nitric oxide synthase gene. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:2172– 6.

Grasemann H, van's Gravesande KS, Buscher R, Knauer N, Silverman ES, Palmer LJ, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase variants in cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 390– 4.

Gregg RG, Simantel A, Farrell PM, Kosciak R, Kosorok MR, Laxova A, Laessig R, Hoffman G, Hassemer K, Mischler EH, Splaingard M: Newborn screening for ciystic fibrosis in Wisconsin: Comparison of biochemical and molecular methods. *Pediatrics* 1997; 99: 819.

Grove SS: Fibrocystic disease of the pancreas in the Bantu. *S Afr Med* 1959; J 5: 113.

Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem* 1999; 274, 21873-7.

Hantash FM, Redman JB, Starn K, Anderson B, Buller A, McGinniss MJ, Quan F, Peng M, Sun W, Strom CM. Novel and recurrent rearrangements in

the CFTR gene: clinical and laboratory implications for cystic fibrosis screening. *J Mol Diagn.* 2007 Sep;9:556-60.

Henrion-Caude A, Flamant C, Roussey M, Housset C, Flahault A, Fryer AA, *et al.* Liver disease in pediatric patients with cystic fibrosis is associated with glutathione S-transferase P1 polymorphism. *Hepatology* 2002; 36:913– 7.

Henry MT, Cave S, Rendall J, O'Connor CM, Morgan K, FitzGerald MX, *et al.* An alpha1-antitrypsin enhancer polymorphism is a genetic modifier of pulmonary outcome in cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:273– 278.

Hergersberg M, Balakrishnan J, Bettecken T, Chevalier-Porst F, Bragger C, Burger R, Einschenk I, Liechti-Gallati S, Morris M, Schorderet D, Thonney F, Moser H, Malik N. A new mutation, 3905insT, accounts for 4.8% of 1173 CF chromosomes in Switzerland and causes a severe phenotype. *Hum Genet* 1997; 100:220-3.

Henrion-Caude A, Flamant C, Roussey M, Housset C, Flahault A, Fryer AA, *et al.* Liver disease in pediatric patients with cystic fibrosis is associated with glutathione S-transferase P1 polymorphism. *Hepatology* 2002; 36:913– 7.

HGMD®-BIOBASE: www.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=CFTR

Higgins C. Transport proteins. Export-import family expands. *Nature.* 1989; 340(6232):342

Hull J, Thomson AH. Contribution of genetic factors other than CFTR to disease severity in cystic fibrosis. *Thorax* 1998; 53:1018– 21

Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ *et al.* Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 1990; 346:362-365.

Johnson MA, Yoshitomi MJ, Richards CS. A comparative study of five technologically diverse CFTR testing platforms. *J Mol Diagn* 2007 Jul; 9:401-7.

Kaplan E, Shwachman H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw KT, Holsclaw DS. Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1968; 279:65-9.

Kartner N, Hanrahan JW, Jensen TJ . Expression of the cystic fibrosis gene in non-epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance. *Cell* 1991; 64:681-691.

Kelly NM, Fitzgerald MX, Tempany E, O'Boyle C, Falkiner FR, Keane CT. Does pseudomonas cross-infection occur between cystic-fibrosis patients? *Lancet* 1982; 2:688-90.

Kere J, Estivill X, Chillón M, Morral N, Nunes V, Norio R, Savilahti E, de la Chapelle A. Cystic fibrosis in a low-incidence population: two major mutations in Finland. *Hum Genet* 1994, 93: 162-166.

Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245:1073-80.

Kerem E, Reisman J, Corey M, Canny GJ, Levison H. Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1992; 326:1187-91.

Kerem E, Kerem B: Genotype-phenotype correlations in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1996; 22:387-395.

Kerem E. Mutation specific therapy: The CF experience (Targeted therapies for cancer and genetic disease symposium, 1/6/2008). 40 European Human Genetics Conference. Barcelona.

- Kiesewetter S, Macek M, Jr., Davis C, Curristin SM, Chu CS, Graham C, Shrimpton AE, Cashman SM, Tsui LC, Mickle J. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat Genet* 1993; 5:274-8.
- Klein I, Sarkadi B, Varadi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1461: 237-262.
- Knowles M, Gatzky J, Boucher R. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1981; 305:1489-95.
- Knowles MR, Paradiso AM, Boucher RC. In vivo nasal potential difference: Techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* 1995; 6: 445.
- Knowles MR, Stutts MJ, Spock A, Fischer N, Gatzky JT, Boucher RC. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* 1983; 221:1067-1070.
- Kopito LE, Kosasky HJ, Sturgis SH, Lieberman BL, Shwachman H. Water and electrolytes in human cervical mucus. *Fertil Steril* 1973; 24:499-506.
- Koscik RL, Farrell PM, Kosorok MR, et al. Cognitive function of children with cystic fibrosis: deleterious effect of early malnutrition. *Pediatr* 2004; 113:1549-58.
- Koscik RL, Lai HJ, Laxova A, Zaremba KM, Kosorok MR, Douglas JA. Preventing early, prolonged vitamin E deficiency: an opportunity for better cognitive outcomes via early diagnosis through neonatal screening. *J Pediatr* 2005; 147(3 Suppl):S51-6.
- Kotloff RM, FitzSimmons SC, Fiel SB. Fertility and pregnancy in patients with cystic fibrosis. *Clin Chest Med* 1992; 13:623-35.

- Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC, Durie P: Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 1178–1184.
- Lai HC, Kosorok MR, Laxova A, Makhholm LM, Farrell PM. Delayed diagnosis of US females with cystic fibrosis. *Am J Epidemiol* 2002; 156: 165-73.
- Lai HC, Kosorok MR, Sondel SA, Chen ST, FitzSimmons SC, Green CG, *et al.* Growth status in children with cystic fibrosis based on the National Cystic Fibrosis Patient Registry data: evaluation of various criteria used to identify malnutrition. *J Pediatr* 1998; 132:478-85.
- Lanng S, Thorsteinsson B, Pociot F, Marshall MO, Madsen HO, Schwartz M, *et al.* Diabetes mellitus in cystic fibrosis: genetic and immunological markers. *Acta Paediatr* 1993; 82:150–4.
- Larriba S, Sumoy L, Ramos MD, Gimenez J, Estivill X, Casals T, *et al.* ATB(0)/SLC1A5 gene. Fine localisation and exclusion of association with the intestinal phenotype of cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet* 2001; 9:860 – 6.
- Lee MG, Wigley WC, Zeng W *et al.*. Regulation of Cl⁻/HCO₃⁻ exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 3414-3421.
- Levin SE, Blumberg H, Zamit R, Schmaman A, Wagstaff L: Mucoviscidosis (cystic fibrosis of the pancreas) in Bantu twin neonates. *S Afr Med J* 1967; 41: 482.
- Littlewood JM. Gastrointestinal complications in cystic fibrosis. *J R Soc Med* 85 Suppl 1992; 19:13-9.
- MacDougall LG: Fibrocystic disease of the pancreas in African children. *Lancet* 1962; 1: 409.

- Macek M Jr. *et al.* (2001). Activities of the National CF Center in Prague: integrated care for CF patients in the Czech Republic. CF European Network, newsletter 5).
- Mahadeva R, Westerbeek RC, Perry DJ, Lovegrove JU, Whitehouse DB, Carroll NR, *et al.* Alpha1-antitrypsin deficiency alleles and the Taq-I G-(A allele in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* 1998a; 11:873– 9.
- Mahadeva R, Stewart S, Bilton D, Lomas DA. Alpha-1 antitrypsin deficiency alleles and severe cystic fibrosis lung disease. *Thorax* 1998; 53:1022– 4. 1998b
- Mastella G, Zanolla L, Castellani C, *et al.* Neonatal screening for cystic fibrosis: long-term clinical balance. *Pancreatology* 2001; 1: 531–37.
- Mastracola T, Porcelli AM, Rugolo M . Role of CFTR and anion exchanger in bicarbonate fluxes in C127 cell lines. *FEBS Lett* 1998; 440: 268-272.
- McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2003; 361(9370):1671-6.
- Mercier B, Verlingue C, Lissens W, Silber SJ, Novelli G, Bonduelle M, Audrezet MP, Ferec C . Is congenital bilateral absence of vas deferens a primary form of cystic fibrosis? Analyses of the CFTR gene in 67 patients. *Am J Hum Genet* 1995; 56:272-7.
- Meng Z, Simmons-Willis TA, Limbach PA. The use of mass spectrometry in genomics. *Biomol Eng* 2004 Jan; 21(1):1-13.
- Merelle ME, Huisman J, Alderden-van der Vecht A, Taat F, Bezemer D, Griffioen RW, *et al.* Early versus late diagnosis: psychological impact on parents of children with cystic fibrosis. *Pediatrics* 2003; 111 (2):346–50.

- Meyer P, Braun A, Roscher AA. Analysis of the two common alpha-1-antitrypsin deficiency alleles PiMS and PiMZ as modifiers of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility in cystic fibrosis. *Clin Genet* 2002; 62:325-7.
- Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Gimenez J, Reis A, Varon-Mateeva R, Macek M, Jr., Kalaydjieva L. The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet* 1994 ; 7:169-75.
- Morral N, Nunes V, Casals T, Chillon M, Gimenez J, Bertranpetit J, Estivill X. Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum Mol Genet* 1993; 2:1015-22.
- Parsons DW. Airway gene therapy and cystic fibrosis. *J Paediatric Child Health* 2005; 41(3): 94-96.
- Pérez Frías J, Pérez Ruiz E, Oliveira C. Aspectos históricos de la Fibrosis Quística: www.fibrosis.org/comunica/congreso/articles/M_histo.htm.
- Pier GB, Grout M, Zaidi T, Meluleni G, Mueschenborn SS, Banting G, Ratcliff R, Evans MJ, Colledge WH. *Salmonella typhi* uses CFTR to enter intestinal epithelial cells. *Nature* 1998; 393:79-82.
- Poulsen JH, Fischer H, Illek B, Machen TE. Bicarbonate conductance and the regulatory capability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *PNAS* 1994; 91:5340-5344.
- Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 1983; 301: 421-422.
- Regelmann WE, Skubitz KM, Herron JM. Increased monocyte oxidase activity in cystic fibrosis heterozygotes and homozygotes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5:27-33

- Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ *et al*. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 1990; 347: 358-363.
- Richards CS, Bradley LA, Amos J, Allitto B, Grody WW, Maddalena A, McGinnis MJ, Prior TW, Popovich BW, Watson MS, Palomaki GE. Standards and guidelines for CFTR mutation testing. *Genet Med*. 2002; 4(5):379-391.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B *et al*. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-1073.
- Rohlfes EM, Shaheen NJ, Silverman LM. Is the hemochromatosis gene a modifier locus for cystic fibrosis? *Genet Test* 1998; 2:85– 8.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N *et al*. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245:1059-65.
- Rosenfeld M. Overview of published evidence on outcomes with early diagnosis from large US observational studies. *J Pediatr* 2005; 147:S11–4.
- Rosenstein BJ, Cutting GR: The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement. *J Pediatr* 1998; 132: 589.
- Roussey M, Storni V, Rault G, Picherot G, Moisan-Petit V, de Braekeleer M, David V, Dagonne M, Dabadie A, Branger B, Bretaudeaue G, Siret D. Comparing the clinical evolution of cystic fibrosis screened neonatally to that of cystic fibrosis diagnosed from clinical symptoms: a 10-year retrospective study in a French region (Brittany). *Pediatr Pulmonol* 2003; 5:342–349.

Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet.* 2003; 67 :471-85.

Rozen R, Schawart RH, Hilman BC, Stanislovitis P, Horn GT, Klinger K, Daigneault J, DeBrackeleer M, Kerem B, Tsui L, *et al*: Cystic Fibrosis mutations in North American populations of French ancestry: Analysis of Quebec French-Canadian and Louisiana Acadian families. *Am J Hum Genet* 1990; 47: 606.

Sauer S. Typing of single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry: principles and diagnostic applications. *Clin Chim Acta.* 2006 Jan; 363(1-2):95-105.

Schneider M, Hirt C, Casaulta C, Barben J, Spinaz R, Bühlmann U, Spalinger J, Schwizer B, Chevalier-Porst F, Gallati S. Large deletions in the CFTR gene: clinics and genetics in Swiss patients with CF. *Clin Genet.* 2007 Jul; 72:30-8.

Schwarz MJ, Malone GM, Haworth A, Cheadle JP, Meredith AL, Gardner A, Sawyer IH, Connarty M, Dennis N, Seller A, *et al*. Cystic fibrosis mutation analysis: report from 22 U.K. regional genetics laboratories. *Hum Mutat* 1995 ; 6:326-33.

Senecal JJ, Toury CR: Deux cas de fibrose kistrique de pancras chez l'enfant Africain realisant le dyndrome du kwashiorkor. *Bull Med L'Afrique Occidentale Fran* 1954; 11 : 95.

Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard LS, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl⁻ channels with altered pore properties. *Nature* 1993; 362:160-4.

Sims EJ, McCormick J, Mehta G, Mehta A. Neonatal screening for cystic fibrosis is beneficial even in the context of modern treatment. *J Pediatr* 2005; 147: S42-46.

- Siret D, Bretaudeau G, Branger B, *et al.* Comparing the clinical evolution of cystic fibrosis screened neonatally to that of cystic fibrosis diagnosed from clinical symptoms: a 10-year retrospective study in a French region (Brittany). *Pediatr Pulmonol* 2003; 35: 342-49.
- Slieker MG, Sanders EA, Rijkers GT, Ruven HJ, van der Ent CK. Disease modifying genes in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2005 ;4 Suppl 2:7-13.
- Slomski R, Schloesser M, Berg LP, Wagner M, Kakkar VV, Cooper DN, Reiss J. Omission of exon 12 in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene transcripts. *Hum Genet* 1992; 89:615-9.
- Sorscher EJ, Kirk KL, Weaver ML, Jilling T, Blalock JE, LeBoeuf RD. Antisense oligodeoxynucleotide to the cystic fibrosis gene inhibits anion transport in normal cultured sweat duct cells. *PNAS* 1991; 88(17): 7759-7762.
- Southern KW, Munck A, Pollitt R, Travert G, Zanolla L, Dankert- oelse, Castellani C. ECFS CF Neonatal Screening Working Group. A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros*. 2007 Jan;6(1):57-65.
- Spence JE, Perciaccante RG, Greig GM, Willard HF, Ledbetter KH, Hejtmancik JF, Pollack MS; O'Brien WE, Beaudet *al*: Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease. *Am J Hum Genet* 1988; 42: 217.
- Stern RC. The diagnosis of cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1997; 336: 487-491.
- Sun X, Guo B. Genotyping single-nucleotide polymorphisms by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight-based mini-sequencing. *Methods Mol Med*. 2006 128:225-30.

Super M: Cystic fibrosis in the South West African Afrikaner. *S Afr Med J* 1975; 49: 818.

Texereau J, Marullo S, Hubert D, Coste J, Dusser DJ, Dall'Ava- Santucci J, *et al.* Nitric oxide synthase 1 as a potential modifier gene of decline in lung function in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 2004;59:156–8

Trapnell BC, Zeiltn PL, Chu C-S *et al.* Down-regulation of cystic fibrosis gene mRNA transcript levels and induction of the cystic fibrosis chloride secretory phenotype in epithelial cells by phorbol ester. *J Biol Chem* 1991; 266:10319-10323.

Trezise AEO, Buchwald M. In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 1991; 353: 434-437.

Verkman A. Small-molecule therapy for Cystic Fibrosis (Targeted therapies for cancer and genetic disease symposium, 1/6/2008). 40 European Human Genetics Conference. Barcelona.

Voss R, Ben-Simon E, Avital A, Godfrey S, Zlotogora J, Dagan JJ, Tikochinski Y, Hillel H: Isodisomy of chromosome 7 in a patient with cystic fibrosis: Could uniparental disome be common in humans? *Am J Hum Genet* 1989; 45: 373.

Wagner JA, Cozens AL, Schulman H, Gruenert DC, Stryer L, Gardner P. Activation of chloride channels in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells by multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Nature* 1991; 349:793-796.

Warburton D(ed): Uniparental disomy: A rare consequence of the high rate of aneuploidy in human gametes. *Am J Hum Genet* 1988; 42: 215.

- Waters DL, Dorney SF, Gaskin KJ, Gruca MA, O'Halloran M, Wilcken B. Pancreatic function in infants identified as having cystic fibrosis in a neonatal screening program. *N Engl J Med* 1990; 322:303-8.
- Waters DL, Dorney SF, Gruca MA, Martin HC, Howman-Giles R, Kan AE, De Silva M, Gaskin KJ. Hepatobiliary disease in cystic fibrosis patients with pancreatic sufficiency. *Hepatology* 1995; 21:963-9.
- Waters DL, Wilcken B, Irwing L, *et al*. Clinical outcomes of newborn screening for cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1999; 80: F1-7.
- Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, Driscoll DA, Klinger K, Mennuti M, Palomaki GE, Popovich BW, Pratt VM, Rohlfes EM, Strom CM, Richards CS, Witt DR, Grody WW. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics mutation panel. *Genet Med*. 2004 Sep-Oct; 6(5):387-91.
- Welsh MJ, Tsui L-C, Boat TF, Beaudet AL: Cystic fibrosis; in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, McGraw-Hill, 1995, vol III, pp 3799-3876.
- Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR (2001). Cystic Fibrosis. In : Scriver CR, Beaudet *al*, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. Eighth ed. McGraw-Hill, Inc. New York: 5121-5188.
- Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993; 73: 1251-1254.
- Wilcken B. Newborn screening for cystic fibrosis: techniques and strategies. *J Inherit Metab Dis*. 2007; 30(4):537-43.
- Wilcken B. Newborn screening for cystic fibrosis: Its evolution and a review of the current situation. *Screening* 1993; 2: 43.

- Wilfond BS, Farrell PM, Laxova A, Mischler E. Severe hemolytic anemia associated with vitamin E deficiency in infants with cystic fibrosis. Implications for neonatal screening. Clin Pediatr (Phila). 1994 Jan; 33(1):2-7.
- Will K, Stuhrmann M, Dean M, Schmidtke J. Alternative splicing in the first nucleotide binding fold of CFTR. Hum Mol Genet 1993; 2(3):231-5.
- Wilschanski M, Corey M, Durie P, Tullis E, Bain J, Asch M, Ginzburg B, Jarvi K, Buckspan M, Hartwick W. Diversity of reproductive tract abnormalities in men with cystic fibrosis. Jama 1996; 276:607-8.
- Wilson DC, Ellis L, Zielenski J, Corey M, Ip WF, Tsui LC, Tullis E, Knowles MR, Durie PR. Uncertainty in the diagnosis of cystic fibrosis: possible role of in vivo nasal potential difference measurements. J Pediatr 1998; 132(4):596-9.
- Wilson DC, Pencharz PB. Nutrition and cystic fibrosis. Nutrition 1998 ;14(10):792-5.
- Wilson JM. Adenoviruses as gene-delivery vehicles. N Engl J Med 1996; 334(18):1185-7.
- Wine JJ. The genesis of cystic fibrosis lung disease. J Clin Invest 1999; 103:309-312.
- Yarden J, Radojkovic D, De Boeck K, Macek Jr M, Zemkova D, Vavrova V, et al. Polymorphisms in the mannose binding lectin gene affect the cystic fibrosis pulmonary phenotype. J Med Genet 2004; 41:629-33
- Yoshimura K, Nakamura H, Trapnell BC, Chu CS, Dalemans W, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin. Nucleic Acids Res 1991 11; 19:5417-23.

Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245:1066-73.

Zielinski J, Rozmahel R, Bozon D *et al.* Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 1991; 10:214-228.

Zielenski J, Tsui LC: Cystic fibrosis: Genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 1995; 29:777-807.

Nec unquam veritas invenietur si contenti fuerimus inventis(...). Qui ante nos scripserunt, non domini nostri sed duces fuerunt. Veritas patet omnibus, nondum est occupata; multum etiam ex illa nostris est posteris relictum.

(Jamás descubriremos algo nuevo, si nos contentamos con lo ya investigado (...). Quienes escribieron antes que nosotros no son amos, sino sólo guías. La realidad está abierta a todos, pero todavía no ha sido explorada; así gran parte de su conocimiento está pendiente de la investigación futura).

GUIBERT DE TOURNAI (Siglo XIII), *De modo addiscendi* (Sobre la manera de aprender).